

SÉRIE A, N° 742

N° D'ORDRE :

1513

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES

DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES PHYSIQUES

PAR

MAURICE LEMOIGNE

1^{re} THÈSE. — CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU RÔLE DES MICROBES DU GROUPE
DU « BACILLUS SUBTILIS » DANS L'ÉPURATION DES EAUX
D'ÉGOUTS. — LEUR ACTION SUR LES MATIÈRES AZOTÉES ET
HYDROCARBONÉES.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le *15* Juin 1913 devant la Commission d'examen.

Président : M. G. BERTRAND.

Examineurs { MM. LEDUC.
FERNBACH.

LAVAL

L. BARNÉOUD & C^{ie}, IMPRIMEURS

8, RUE RICORDAINE, 8

1913

SÉRIE A, N° 742

N° D'ORDRE :
1513

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES

DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES PHYSIQUES

PAR

MAURICE LEMOIGNE

1^{re} THÈSE. — CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU RÔLE DES MICROBES DU GROUPE
DU « BACILLUS SUBTILIS » DANS L'ÉPURATION DES EAUX
D'ÉGOUTS. — LEUR ACTION SUR LES MATIÈRES AZOTÉES ET
HYDROCARBONÉES.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le *10* Juin 1913 devant la Commission d'examen



Président : M. G. BERTRAND.

Examineurs : { MM. LEDUC.
FERNBACH.

LAVAL

L. BARNÉOUD & C^{ie}, IMPRIMEURS

8, RUE RICORDAINE, 8

1913

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM

<i>Doyen</i>	P. APPELL, <i>Profess.</i>	Mécanique analytique et mécan. céleste
<i>Doyen honoraire</i>	G. DARBOUX. —	Géométrie supérieure.
<i>Profess honoraires.</i> {	Ch WOLF	
	J. RIBAN.	

<i>Professeurs</i>	LIPPMANN	Physique
	BOUTY.....	Physique.
	BOUSSINESQ	Phys.mathém. et calcul des probabilités.
	PICARD	Analyse supér. et algèbre supérieure
	Y. DELAGE	Zoologie, anatomie, physiologie compar.
	G. BONNIER	Botanique.
	DASTRE	Physiologie
	KOENIGS.....	Mécanique physique et expérimentale.
	VELAIN.....	Géographie physique.
	GOURSAT.....	Calcul différentiel et calcul intégral.
	HALLER.....	Chimie organique.
	JOANNIS.....	Chimie (Enseignement P. C. N.).
	JANET.....	Physique —
	WALLERANT.....	Minéralogie.
	ANDOYER.....	Astronomie.
	PAINLEVÉ.....	Mécanique rationnelle.
	HAUG	Géologie.
	HOUSSAY.....	Zoologie.
	H. LE CHATELIER.	Chimie.
	G. BERTRAND.. ..	Chimie biologique.
	M ^{me} P. CURIE.....	Physique générale.
	CAULLERY	Zoologie (Évolution des êtres organisés)
	C. CHABRIÉ.....	Chimie appliquée.
	G. URBAIN.....	Chimie
	EMILE BOREL.....	Théorie des fonctions.
	MARCHIS	Aviation.
	JEAN PERRIN.....	Chimie physique.
	G. PRUVOT.....	Zoologie, anatomie, physiol. comparée
	MATRUCHOT.....	Botanique.
	ABRAHAM	Physique.
	CARTAN	Calcul différentiel et calcul intégral.
	Cl. GUICHARD.....	Mathématiques générales.
	N.....	Application de l'analyse à la géométrie.
	N.....	Histologie.
<i>Professeurs-adjoints</i>	PUISEUX	Mécanique et Astronomie.
	LEDUC.....	Physique.
	MICHEL	Minéralogie.
	HEROUARD.....	Zoologie.
	LÉON BERTRAND.....	Géologie.
	RÉMY PERRIER.....	Zoologie (Enseignement P. C. N.).
	MOLLIARD.....	Physiologie végétale.
	COTTON	Physique.
	LESPIEAU	Chimie.
	GENTIL.....	Pétrographie.
	SAGNAC.....	Physique (Enseignement P. C. N.).
	PEREZ.....	Zoologie (Évolution des êtres organisés.

Secrétaire..... D. TOMBECK.

A MONSIEUR LE DOCTEUR ÉMILE ROUX

MEMBRE DE L'INSTITUT ET DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

DIRECTEUR DE L'INSTITUT PASTEUR

A MONSIEUR A. MÜNTZ

MEMBRE DE L'INSTITUT

PROFESSEUR A L'INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE

A MONSIEUR P. MAZÉ

CHEF DE SERVICE A L'INSTITUT PASTEUR

Hommage respectueux.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION	3
Rôle naturel des microbes du groupe du <i>B. subtilis</i>	5
Leur action dans le processus d'épuration des eaux d'égouts	5

PREMIÈRE PARTIE

Nutrition azotée

CHAPITRE PREMIER. — Bilan de l'azote dans la combustion des matières azotées par les microbes du groupe du <i>B. subtilis</i>	11
CHAPITRE II. — Utilisation de l'azote nitrique par le <i>B. subtilis</i> et quelques microbes voisins	16

DEUXIÈME PARTIE

Nutrition hydrocarbonée. Assimilation du saccharose

CHAPITRE PREMIER. — Historique	26
CHAPITRE II. — Respiration du <i>B. subtilis</i> en milieux sucrés.	30
Méthodes employées	30
Résultats obtenus	33
Conclusions	37
CHAPITRE III. — Produits de la fermentation	41
Acide valérianique ; alcool éthylique, méthylglyoxal	42
Acétylméthylcarbinol	44
CHAPITRE IV. — Présence du 2-3 butylèneglycol. Sa recherche, son extraction.	57
CHAPITRE V. — Origine et rôle physiologique de l'acide valérianique, de l'acétylméthylcarbinol et du 2-3 butylèneglycol	66
Conclusions de la deuxième partie	72
Lemoigne	1

TROISIÈME PARTIE

**Produits intermédiaires de la fermentation butylèneglycolique.
Rôle de l'acide lactique**

	Pages
CHAPITRE PREMIER. — Utilisation de l'acide lactique par le <i>B. subtilis</i> et le <i>B. lactis aerogenes</i>	77
CHAPITRE II. — Oxydation du propylglycol par le <i>B. subtilis</i> . . .	83
CHAPITRE III. — Utilisation de l'acide lactique par le ferment acé- tique	88
Production d'acétylméthylcarbinol	89
Conclusions de la troisième partie	93
CONCLUSIONS GÉNÉRALES.	95
BIBLIOGRAPHIE	97

INTRODUCTION

Le problème de l'épuration des eaux d'égouts prend pour les grandes agglomérations de plus en plus d'importance. Le volume des eaux à épurer augmente en effet constamment et le système de l'épandage qui, bien conduit, donne les meilleurs résultats, devient le plus souvent inapplicable par l'étendue des terrains qu'il exige. Les villes qui ne peuvent envoyer leurs eaux résiduaires directement à la mer, sont contraintes de leur faire subir une épuration artificielle avant de les rejeter dans les rivières. Les procédés d'épuration bactérienne par fosses septiques, lits de contact ou lits percolateurs, ont pris naissance en Angleterre et se sont rapidement généralisés dans ce pays où j'ai eu l'occasion de visiter de nombreuses installations. Depuis quelques années, l'usage de ce système d'épuration s'est développé en France grâce surtout aux travaux et aux efforts de M. le D^r CALMETTE qui a réuni dans une série de publications tous les documents qui se rapportent à ce sujet (1).

On est maintenant assez bien fixé sur l'ensemble du processus de l'épuration, mais il faut reconnaître néanmoins que bien des détails nous échappent, restent obscurs ou vagues. En particulier, nous ne connaissons pas avec netteté quels sont les principaux agents de ce phénomène et surtout quel est le mécanisme intime de leur action. Ce sont cependant des questions qui ne sont pas à négliger : leur étude pourra peut-être conduire à des perfectionnements des méthodes employées et de plus présentera évidemment un intérêt théorique.

C'est qu'en effet l'épuration des eaux d'égouts n'est pas seulement un problème important pour l'hygiène publique, c'est aussi un phénomène naturel d'un haut intérêt. Ce qui se passe dans les fosses septiques, dans les lits de contact, dans les lits percolateurs, c'est ce qui se produit constamment, naturellement dans le sol, mais avec une plus grande intensité. L'épuration des eaux d'égouts est en somme, mais rapide et amplifié, tout le lent et puissant travail de la terre par lequel toute matière organique est disloquée, hydratée, dédoublée, oxydée et finalement gazéifiée et minéralisée.

Cette simplification de toute matière organique par le sol est surtout l'œuvre des microorganismes : moisissures et bactéries.

Connaître les microbes agissants et parmi eux surtout les plus actifs, être fixé sur leurs propriétés biologiques et sur le mécanisme chimique de leur action, sont évidemment des questions intéressantes. Or il est plus facile de les aborder en étudiant l'épuration bactérienne des eaux d'égouts, car dans les fosses septiques, les lits percolateurs où les phénomènes de minéralisation sont intenses, il y a chance qu'une sélection se soit faite et que l'on trouve surtout les microbes dont le rôle naturel est le plus grand. Les bactéries anaérobies qui travaillent dans les fosses septiques sont incapables à elles seules d'effectuer une épuration complète. Au contraire, les organismes aérobies des lits percolateurs peuvent y parvenir. C'est donc eux que j'ai tout d'abord étudiés.

Les travaux faits en ce sens sont nombreux et on peut dire que dans les eaux d'égouts et dans les lits percolateurs on a trouvé presque tous les microbes saprophytes et beaucoup de microbes pathogènes. Tous peuvent, en une certaine mesure, participer à l'épuration. Mais ce sont les plus abondants, les plus fréquents qui auront le rôle le plus actif. C'est ainsi que M. le Dr CALMETTE et ses collaborateurs ont constaté dans les eaux épurées de leur station de Lille la présence d'organismes très variés : les streptocoques, le *B. fluorescens liquefaciens*, le *Bacille pyocyannique*, le *B. coli* étaient abondants, mais le

B. subtilis, le *B. megatherium*, le *Proteus mirabilis*, l'*oidium lactis* dominaient (5).

Mes analyses furent faites avec des scories des lits percolateurs et des eaux épurées des stations de Gennevilliers (Jardin d'Essais) et de Mesly-Créteil. Elles furent faites aux diverses époques de l'année. J'ai trouvé un grand nombre d'espèces diverses et je citerai parmi celles que j'ai eu l'occasion d'isoler plusieurs fois le *B. violaceus*, le *B. prodigiosus*, une *torula* rouge, le *B. pyocyanique*, des streptocoques et des *proteus*. Mais les organismes qui de beaucoup dominèrent furent d'une part des coccobacilles se rapprochant soit du *Bacterium Coli*, soit du *B. lactis aerogenes* et constituant une famille dont le *pneumobacille de Friendlander* pourrait servir de type ; d'autre part, des bacilles, souvent mobiles, caractérisés surtout par des endospores très résistantes, et qui forment un groupe homogène dont le *Bacillus subtilis* est le type. D'ailleurs, le *B. subtilis* était le plus fréquent avec le *B. mesentericus ruber*.

J'ai fait avec tous ces microbes des essais de cultures en milieux peptonés et en milieux sucrés. J'ai mesuré les quantités d'ammoniaque formée et la proportion de sucre détruit. Ce furent les bactéries du groupe du *B. subtilis* qui eurent l'action la plus intense sur ces matières organiques.

Donc dans les lits percolateurs dont je me suis occupé, aux époques où j'ai fait les prélèvements, je puis assurer que ce sont les microbes du groupe du *B. subtilis* qui jouaient le principal rôle dans l'épuration.

C'est là une conclusion qui concorde avec les résultats observés à Lille par M. le Dr CALMETTE et ses collaborateurs puisque ces savants citent parmi les bactéries dominantes isolées des eaux épurées de leur station expérimentale, le *B. subtilis*, le *B. megatherium* et le *B. mycoïdes*. Beaucoup d'autres auteurs ont d'ailleurs trouvé ces bactéries dans les mêmes conditions.

J'ai vérifié d'autre part qu'elles sont très répandues dans la terre et dans les eaux. Dominantes dans les eaux potables de Saïgon et de Cholon où j'ai commencé à les étudier, je les ai

toujours retrouvées et toujours en abondance dans tous les sols, toutes les eaux que j'ai eu à analyser. D'ailleurs les auteurs qui se sont occupé des microbes du sol ont toujours signalé comme très fréquents, le *B. subtilis*, le *B. mesentericus* et autres microbes analogues et notamment le *B. mycoïdes* auquel MARCHAL assigna même un rôle prépondérant (6).

Les bactéries du groupe du *B. subtilis*, tant par leur fréquence et leur abondance dans la nature que par l'intensité de leur action sur les matières organiques, jouent donc un rôle primordial dans les processus de gazéification et de minéralisation des produits d'origine végétale et animale, en conditions de vie aérobie. C'est ce qui m'a amené à étudier ces organismes au point de vue biologique.

Ces microbes forment un groupe très vaste mais très homogène que l'on peut appeler le groupe du *Bacillus subtilis*. Ce sont des bacilles aérobies, mobiles lorsqu'ils sont jeunes, capables de prendre le Gram et de liquéfier la gélatine. Ils présentent des endospores extrêmement résistantes aux divers agents physiques et chimiques.

Les travaux de morphologie et de classification qui les concernent sont très nombreux et je ne citerai, parmi les plus importants, que ceux de GOTTHEIL (7), de MEYER (8) et parmi les plus récents celui de CHESTER (9).

Malgré l'abondance des documents qui s'y rattachent et, pourrait-on dire, à cause même de cette abondance, il existe une grande confusion dans la classification de cette famille de microbes. Très souvent les descriptions sont trop sommaires, basées sur des caractères incertains, variables ou mal observés, si bien qu'un même bacille reçoit des noms divers et qu'une même dénomination confond des bactéries différentes.

Dans ce travail, je ne me suis placé qu'au point de vue physiologique, aussi, sauf deux exceptions concernant le

Bacillus subtilis et le *Bacillus mesentericus ruber*, je n'ai pas donné de nom aux divers microbes que j'ai utilisés. Je me suis contenté de vérifier qu'ils appartiennent bien au groupe du *B. subtilis* et je les ai désignés par leur origine et un numéro d'ordre.

Je n'ai pas entrepris l'étude complète de la biologie de ces bactéries : ce serait là une œuvre trop longue et trop vaste. Je n'ai fait qu'aborder certaines questions qui peuvent présenter un intérêt pour expliquer le mécanisme de l'épuration des eaux d'égouts et la minéralisation des matières organiques dans la nature.

Ce travail comprendra deux parties :

Dans la première partie, je traiterai successivement deux problèmes qui intéressent particulièrement les phénomènes de l'épuration des eaux d'égouts et qui se rapportent à la nutrition azotée des microbes du groupe du *B. subtilis*.

1° Bilan de l'azote dans la fermentation des matières azotées organiques par les bactéries de ce groupe ;

2° Dénitrification par ces organismes.

Dans la seconde partie, j'ai cherché à préciser le mécanisme de la combustion du sucre par le *B. subtilis* et les microbes voisins.

J'ai été ainsi amené à étudier successivement :

1° Les échanges gazeux produits par une culture de ces bactéries au cours de la combustion du sucre ;

2° Les produits formés dans cette oxydation ;

3° Les produits intermédiaires de cette fermentation.

PREMIÈRE PARTIE

NUTRITION AZOTÉE

Les microbes du groupe du *B. subtilis* attaquent avec une très grande intensité la plupart des matières azotées organiques qu'ils dédoublent, puis oxydent. Leur action sur certains produits et en particulier sur la caséine a été spécialement étudiée. DUCLAUX notamment a recherché le mécanisme de la dislocation de cette substance par le *Tyrothrix tenuis* et *T. filiformis*, le *T. distortus* et autres qui tous appartiennent au groupe du *B. subtilis* (10). La dégradation de la caséine est poussée très loin et les produits en sont l'eau, l'acide carbonique, l'ammoniaque, quelquefois de l'urée, des acides aminés, dont la leucine et la tyrosine, et enfin des acides gras dont les plus fréquents sont l'acide acétique et l'acide valériannique.

La peptone, l'albumine, la fibrine et presque toutes les matières albuminoïdes subissent, sous l'influence de ces bactéries, des fermentations analogues.

On a souvent pensé que ces microbes attaquaient les matières azotées organiques de préférence à tout autre aliment. Cela est vrai, dans le lait par exemple, où ils digèrent rapidement la caséine sans toucher au lactose. Mais cela tient simplement à ce qu'ils ne peuvent hydrolyser cet hydrate de carbone. Si, dans un milieu riche en matières albuminoïdes on ajoute un produit carboné assimilable, comme le saccharose,

le glucose, ces organismes oxyderont surtout cette substance sans presque toucher aux composés azotés.

Par exemple, le *B. subtilis* ensemencé dans du lait additionné de 2 o/o de saccharose, le coagule, puis digère la caséine comme dans du lait normal, mais moins rapidement et moins complètement, bien que la culture soit plus belle.

Un bouillon peptoné sucré ou glyciné donnera sous l'influence de cette bactérie très peu d'ammoniaque et d'acide valérienique alors que le même bouillon, sans matière ternaire, fournira, avec un développement microbien moindre, beaucoup de ces deux produits qui indiquent une dégradation avancée et intense de la peptone.

Donc presque toutes les matières organiques azotées sont facilement attaquées par ces bactéries du groupe du *subtilis*, mais leur combustion n'est rapide et importante qu'autant que le milieu n'offre pas d'autre aliment ternaire facilement assimilable. Dans ce cas, en effet, ces organismes n'attaquent les matières albuminoïdes que pour en assimiler l'azote qui leur est nécessaire.

Ces microbes peuvent d'ailleurs assimiler l'azote sous presque toutes ses formes : c'est ainsi qu'ils utilisent les acides aminés, les amides, les sels ammoniacaux, les nitrites et les nitrates.

L'étude de la nutrition azotée de ces organismes présente de nombreuses questions intéressantes.

Je ne me suis occupé que de deux problèmes qui concernent l'épuration bactérienne des eaux d'égouts.

J'étudierai successivement dans deux chapitres :

1^o Le bilan de l'azote dans la combustion des matières azotées par ces bactéries ;

2^o L'utilisation des nitrates par le *B. subtilis* et quelques microbes voisins.

CHAPITRE PREMIER

Bilan de l'azote dans la combustion des matières azotées par les microbes du groupe du " *B. subtilis* "

MM. MUNTZ et LAINÉ dans leurs travaux sur la nitrification intensive et sur l'épuration biologique des eaux d'égouts ont constaté que près de 60 o/o de l'azote total est transformé par les bactéries des lits percolateurs en azote gazeux (11). Ce fait a d'ailleurs été signalé depuis par les expérimentateurs qui ont étudié cette question.

MM. MUNTZ et LAINÉ ont de plus démontré que cette gazéification de l'azote se produisait également dans les sols arrosés par les eaux d'égouts bien qu'à un moindre degré que dans les lits bactériens (11).

Donc il existe des microorganismes qui par un processus inconnu sont capables de disloquer complètement la molécule azotée et de mettre l'azote sous sa forme gazeuse. C'est là un fait pratiquement important mais qui présente, en outre, au point de vue théorique, un réel intérêt.

En effet, des recherches très nombreuses et souvent contradictoires faites en physiologie animale et en physiologie végétale, on est arrivé à admettre que ni les animaux, ni les végétaux ne pouvaient dégager d'azote gazeux par la combustion des matières organiques azotées. Il serait donc intéressant de posséder en cultures pures, des organismes capables d'effectuer une telle réaction et d'essayer à en préciser le mécanisme.

C'est pourquoi j'ai recherché si les microbes du groupe du *B. subtilis* ne pouvaient pas provoquer cette déperdition d'azote gazeux.

MM. DEHERAIN et DUPONT qui avaient constaté une perte sensible d'azote à l'état gazeux dans la fabrication du fumier de ferme, ont étudié l'action du *B. mesentericus ruber* sur la légumine (12). Ce microbe avait été isolé du fumier et était cultivé dans une infusion de farine de haricots contenant 256 milligrammes d'azote par litre.

Je reproduis dans le tableau suivant les résultats qu'ils ont obtenus.

Matières dosées	Exp. I	Exp. II	Exp. III
	sans courant d'air N en mgr.	avec courant d'air N en mgr.	avec courant d'air N en mgr.
Co ² produit	non dosé	1.410	1.662
N ammoniacal	33	91	107
N organique dans le liquide	124	137	129
N organique dans le précipité rouge.	0	14	86
N total retrouvé	157	242	245
N perdu à l'état libre	99	14	10,9
Perte pour 100 d'azote introduit . .	38,6	5,4	4,1

Et les auteurs concluent : « ... Si le *mesentericus ruber* est privé d'air il ne forme plus que de faibles quantités d'ammoniaque et disloque complètement la matière organique avec dégagement d'azote libre... »

Le *mesentericus ruber* est un aerobie strict et privé d'air cesse de se développer. Dans l'expérience I d'ailleurs, le poids de la culture devait être insignifiant puisque les auteurs n'ont pu doser l'azote dans le précipité rouge qui est essentiellement formé de corps microbiens et de spores. Donc cette bactérie disloquerait la molécule de matière azotée d'autant plus profondément que son développement serait moindre.

J'ai repris ces essais avec plusieurs microbes du groupe du *B. subtilis*, isolés des eaux d'égouts, de la terre et du lait.

Les cultures étaient pures et leur pureté a été vérifiée à la fin de l'expérience, avant l'analyse.

Le milieu de culture était un bouillon de haricots additionné de 2 o/o de peptone de CHAPOTEAUT. Il était donc riche en matières azotées. Je l'ai réparti par 100 cc. dans des fioles d'Erlenmeyer de 250 cc. munies d'un bouchon de caoutchouc à deux trous. Dans l'un passait un tube (*a*) qui plongeait dans le liquide : dans l'autre un tube court (*b*). Ces deux tubulures avaient à leurs extrémités un petit tampon de coton destiné à filtrer l'air.

Tout le système, tubes et bouchon, était stérilisé à l'autoclave et adapté aseptiquement au flacon préalablement ensemencé.

Je recouvrais le bouchon d'un peu de paraffine stérile. Les cultures étaient mises pendant neuf jours dans la chambre étuve à une température de 29-30°. Je faisais passer par les tubulures *a* et *b* un courant d'air qui barbotait dans la culture. Cet air passait au préalable dans un tube en U contenant de la ponce sulfurique qui retenait toute trace d'ammoniaque, puis dans un flacon laveur rempli d'eau distillée. Un autre flacon laveur placé après la culture et renfermant 10 cc. d'acide sulfurique décimormal recueillait l'ammoniaque qui aurait pu être entraînée.

Dans ces conditions, j'obtenais des cultures belles en général et les pertes d'azote qui pouvaient se produire ne pouvaient être attribuées qu'à la gazéification de l'azote par combustion de la peptone par les organismes ensemencés.

Au moment de l'analyse j'introduisais immédiatement 2 cc. d'acide sulfurique chimiquement pur dilué au tiers. J'amenais à un volume mesuré exactement. Pour rendre homogène, j'ajoutais des perles de verre propres et riches et j'agitais longuement, le ballon étant bouché. Les amas microbiens étaient dissociés et dans le liquide ainsi obtenu je dosais l'azote ammoniacal et l'azote total.

Azote ammoniacal. — Je distillais une partie aliquote de la culture en présence d'un léger excès de magnésie. L'ammoniaque était recueillie dans l'acide sulfurique décimormal. Cette

méthode n'est pas rigoureuse mais était suffisante pour moi, car je ne faisais ce dosage que pour avoir une idée approximative de l'intensité de l'action du microbe sur la matière azotée.

Azote total. — Une partie aliquote de la culture rendue acide était évaporée doucement au bain-marie.

Je faisais le dosage par la méthode de KJELDAHL.

Les résultats sont réunis dans le tableau suivant. Ils sont exprimés en milligrammes d'azote pour 100 cc. de culture.

Microbes		Azote ammoniacal			Azote total			
Origine	N°	avant	après	différence	avant	après	différence	différence o/o
Terre.	I. 7	3,86	66,72	+ 62,86	156,58	156,26	— 0,32	— 0,20
Terre.	II. 3	3,86	55,16	+ 51,30	156,58	156,80	+ 0,22	+ 0,14
Terre.	II. 7	3,86	67,40	+ 63,54	156,58	157,08	+ 0,50	+ 0,32
Terre.	II. 8	3,86	65,76	+ 61,90	156,58	157,08	+ 0,50	+ 0,32
Terre.	II. 9	3,86	72,73	+ 68,87	156,58	155,89	— 0,69	— 0,44
Eau d'égout après épuraton	1	4,62	45,09	+ 40,47	175,14	174,79	— 0,35	— 0,20
	2	4,06	83,51	+ 79,45	242,48	243,00	+ 0,52	+ 0,21
	3	4,62	38,56	+ 33,94	175,14	174,90	— 0,24	— 0,14
	5	4,62	48,37	+ 43,75	175,14	174,88	— 0,26	— 0,15
	6	4,62	54,28	+ 49,66	175,14	175,41	+ 0,27	+ 0,15
	7	4,62	11,00	+ 6,38	175,14	175,50	+ 0,36	+ 0,21
	8	4,62	7,30	+ 2,68	175,14	175,50	+ 0,36	+ 0,21
	9	4,62	56,36	+ 51,74	175,14	175,14	0,00	0,00
	10	4,62	43,58	+ 38,96	175,14	174,87	— 0,27	+ 0,15
	12	4,62	4,87	+ 0,25	175,14	175,50	+ 0,36	+ 0,21
	III	4,06	81,41	+ 77,35	242,48	243,00	+ 0,52	+ 0,21
	III	4,06	9,85	+ 5,79	242,48	243,05	+ 0,57	+ 0,23
	IV	4,06	28,60	+ 14,54	242,48	242,25	— 0,23	— 0,09
	V	4,06	52,59	+ 48,53	242,98	242,98	+ 0,50	+ 0,20

Ces résultats ont été obtenus avec des microbes du groupe du *B. subtilis*, mais différents tous les uns des autres. J'obtiens des différences tantôt positives, tantôt négatives entre les quantités d'azote total contenu dans le bouillon initial et celle d'azote contenu dans la culture au moment de l'analyse. Mais ces différences sont faibles et atteignent au plus 0 mgr. 69 d'azote, soit 0,44 o/o de l'azote total. Or par suite de la non-homogénéité des cultures microbiennes, ces faibles différences rentrent dans les limites des erreurs d'analyse.

Donc dans les conditions dans lesquelles je me suis placé, les microbes du groupe du *B. subtilis* attaquent énergiquement la peptone, mais se montrent incapables de dégager, au cours de cette combustion, de l'azote à l'état gazeux. D'autre part, elles n'en assimilent pas non plus.

En conséquence, la déperdition d'azote constatées dans les lits percolateurs et dans le sol doit être attribuée à une autre cause que la combustion des matières organiques azotées par les bactéries du groupe du *B. subtilis*.

CHAPITRE II

Utilisation de l'azote nitrique par le " *B. subtilis* " et quelques microbes voisins

La réduction des nitrates par le microorganisme a donné lieu à un très grand nombre de travaux, soit de la part des bactériologistes qui ont utilisé cette réaction comme un diagnostic pour caractériser certaines espèces, soit de la part des physiologistes et chimistes qui ont cherché à en approfondir le mécanisme ou à en préciser la signification.

Le phénomène de la dénitrification est considéré en général comme un processus spécial d'oxydation des matières organiques et comme une respiration intramoléculaire grâce à laquelle les microbes peuvent vivre à l'abri de l'air comme ils le feraient en vie aérobie : l'oxygène des nitrates remplace l'oxygène atmosphérique quand celui-ci vient à faire défaut. L'aération gênera donc en général la dénitrification qui, au contraire, deviendra plus intense dans des conditions d'asphyxie. En fait, presque tous les essais effectués au sujet de ce phénomène l'ont été dans des conditions d'anaérobiose plus ou moins absolue.

M. MAZÉ a montré qu'au contraire la dénitrification était avant tout un processus d'assimilation de l'azote par les êtres vivants (13). Tout ce qui favorise le développement du microbe doit par cela même favoriser la réduction des nitrates par cet organisme. Les microbes aérobies devront donc

dénitrifier en présence de l'air, et plus l'aération sera intense plus la dénitrification devra être active.

Le cas des microbes du groupe du *B. subtilis* était particulièrement intéressant à étudier à ce point de vue : ce sont en effet des aérobies stricts et de plus ils ont été classés parmi les organismes capables de réduire les nitrates en nitrites.

Je citerai tout d'abord un tableau dû à CHESTER (9) et qui résume bien ce que savent les bactériologistes au sujet de la dénitrification par ces bacilles.

Les divers microbes ont été ensemencés dans un bouillon nitraté et on recherche les nitrites.

Espèces	Réaction des nitrites
<i>B. asterosporus</i> . .	+
<i>B. ruminatus</i> . .	+
<i>B. megatherium</i> . .	—
<i>B. cereus</i> . . .	+
<i>B. mycoides</i> . . .	+
<i>B. tumescens</i> . .	—
<i>B. subtilis</i> . . .	+
<i>B. simplex</i> . . .	+
<i>B. mesentericus</i> . .	—
<i>B. fusiformis</i> . .	—

STOKLASA et VITEK ont étudié la réduction des nitrates par divers microbes dont certains appartiennent au groupe du *B. subtilis* (14). Je ne citerai que quelques-uns des résultats obtenus par ces auteurs et choisis parmi les plus significatifs.

Les expériences étaient faites en milieu minéral additionné de 2 gr. ou 2 gr. 5 par litre d'une matière ternaire (hydrate de carbone ou sel organique) et de 2 gr. de nitrate de sodium. La température était de 28°-30°.

Les résultats sont exprimés en grammes par litre.

EXPÉRIENCES FAITES AVEC LE GLUCOSE

Microbe	durée	Réaction des		Azote		
		nitrites	nitrates	ammon.	nitrique et nitreux	Organique
<i>B. subtilis</i> .	34 jours	très forte	très forte	0,00784	0,2912	0,02868
<i>B. mycoides</i> .	30 —	forte	très forte	0,0672	0,2072	0,0434
Lemoigne						2

EXPÉRIENCES FAITES AVEC LE LEVULOSE

Microbe	durée	Réactions des		ammon.	Azote	
		nitrites	nitrites		nitrique et nitreux	Organique
<i>B. mesentericus vulgaris</i> .	37 jours	Faible	très forte	0,0168	0,2912	0,0166
<i>B. subtilis</i> .	30 —	très forte	très forte	0,02128	0,2856	0,01720
<i>B. mycoides</i> .	30 —	très faible	très forte	0,00616	0,3024	0,01572

C'est le *B. mycoides* en milieu glucosé qui est le dénitrifiant le plus actif puisqu'il transforme en azote ammoniacal 20,69 o/o de l'azote nitrique alors que dans les mêmes conditions le *B. subtilis* n'en réduit que 2,41 o/o.

Il y a peu de matière organique, mais il y en a suffisamment puisqu'il en reste dans presque tous les cas.

La conclusion de ce travail est que certains microbes du groupe du *B. subtilis* sont des dénitrifiants qui transforment l'azote nitrique en azote ammoniacal. Mais il y a toujours formation de nitrites et la réduction n'est jamais totale.

J'ai repris ces expériences en m'inspirant des travaux de M. Mazé sur le phénomène de la dénitrification en général.

Pour rechercher des microbes dénitrifiants, j'ai ensemencé sept bacilles du groupe du *B. subtilis*, isolés des lits percolateurs, dans des tubes à essais contenant 25 cc. de bouillon de haricots, additionné de 2 o/o de saccharose et de 0,2 o/o de nitrate de sodium. Les tubes étaient maintenus inclinés dans l'étuve à 30° pendant 15 jours.

Je recherchais les nitrites par le réactif de Tromsdorff et les nitrates par le sulfate de diphénylamine. S'il y avait de l'acide nitreux, je le détruisais par un peu d'urée en milieu acide, l'acide azotique restait seul et pouvait être caractérisé.

Les résultats furent les suivants :

Microbe :	<i>B. subtilis</i>	<i>B. mesentericus ruber</i>	n° 3	n° 4	n° 11	n° 5	n° 6
Réactions { des nitrites.	o	o	o	+	+	o	+
{ des nitrates.	o	o	o	+	+	+	+

Trois microbes ont fait disparaître tout l'azote oxydé. Deux, les n° 4 et n° 11, ont donné des nitrites. Quant aux microbes 5 et 6, pour affirmer qu'ils ne sont pas dénitrifiants, il faudrait faire des dosages et opérer dans des conditions très variées.

J'ai surtout employé dans mes essais le *B. subtilis* et le *B. mesentericus ruber*. J'ai résumé les principaux résultats dans une note parue en 1911 (15).

J'ai recherché tout d'abord si l'oxygène de l'acide nitrique ne peut pas remplacer l'oxygène de l'air.

Expérience. — Du bouillon de haricots additionné de 4 o/o de saccharose et de 0,2 o/o de nitrate de soude est réparti par 20 cc. dans des tubes à essais et dans des boules. Les tubes sont maintenus inclinés de manière à offrir à l'air une large surface et les boules après ensemencement sont fermées à la lampe après qu'on y a fait le vide à la trompe à eau. Je fais bouillir longtemps dans le vide le bouillon pour le bien priver d'air.

Dès le lendemain, un voile épais, plissé s'est formé dans chaque tube. Dans les boules il y a un léger développement mais presque insignifiant.

Ces cultures ont été maintenues à 30°.

	Tubes inclinés			Boules		
	jours	nitrites	nitrites	jours	nitrites	nitrites
<i>B. subtilis</i> . . .	1	0	0	8	0	+
<i>B. mesentericus</i> .	1	0	0	8	0	+

Le 8^e jour les boules sont ouvertes aseptiquement : l'air pénètre et le 9^e jour il n'y a plus ni nitrates ni nitrites ce qui prouve que l'ensemencement avait bien eu lieu.

Expérience. — Deux boules sont reliées l'une à l'autre par une soudure. Elle contiennent chacune en bouillon de haricots additionné de 4 o/o de sucre et 0,2 o/o de nitrate de sodium. Une des boules est ensemencée avec le *B. subtilis*. On fait le vide dans l'appareil avec la trompe à eau et on ferme à la lampe. Dans la boule ensemencée on observe le lendemain un léger développement. Le deuxième jour je renverse un peu de son contenu dans la seconde boule, dans laquelle, le cinquième jour il n'y a pas trace de culture. L'ensemencement a eu cependant lieu puisque 24 heures après que l'on a fait rentrer l'air aseptiquement, il y a un voile fortement plissé.

J'ai refait cette expérience avec des concentrations diverses de nitrate de Soude et j'ai toujours obtenu des résultats analogues.

Donc ces microbes peuvent réduire l'acide nitrique, mais l'oxygène des nitrates est incapable de remplacer l'oxygène libre. Mais j'ai opéré en privant d'air le microbe dès le début et si la respiration intramoléculaire aux dépens du nitrate ne peut provoquer la croissance de ces organismes ne pourrait-elle pas suffire à leur entretien ? En d'autres termes, on peut se demander si une culture de ces bacilles déjà avancée dans son développement ne pourrait pas réduire l'azote nitrique en l'absence d'oxygène libre.

C'est pour résoudre cette question que j'ai fait l'essai suivant :

Expérience.— Du bouillon de haricots additionné de 3 o/o de saccharose et de 1 o/o de nitrate de soude est réparti par 40 cc. dans un flacon d'ERLENMEYER de 250 cc. et dans une boule. Je fais le vide partiel dans la boule après ensemencement et la ferme à la lampe. Le microbe employé était le *B. subtilis*.

J'examine les cultures après 5 jours.

Dans le flacon il y a un voile épais très plissé, il n'y a plus traces de nitrate et il n'y a pas de nitrites. La réduction a donc été complète.

Dans la boule il s'est formé un voile mince, discontinu qui à partir du deuxième jour ne progresse plus du tout. Malgré ce développement appréciable, malgré l'excès de matière organique, l'analyse montre qu'il y a encore beaucoup de nitrates et qu'il s'est formé des nitrites.

Donc non seulement l'oxygène libre est nécessaire pour permettre à la semence de pousser, mais il est encore indispensable à une culture ayant déjà un sensible développement.

La dénitrification ne peut donc pas être considérée dans le cas des microbes du groupe du *B. subtilis* comme un phénomène de résistance à l'asphyxie, puisqu'elle ne peut se produire qu'en présence de l'air.

D'autre part, les essais précédents ont montré qu'elle était rapide en présence d'oxygène libre. L'expérience suivante, choisie parmi de nombreuses autres analogues, indique qu'elle est d'autant plus intense que l'aération se fait mieux.

Expérience. — Du bouillon de haricots additionné de 3 o/o de sucre et

de 1 o/o de nitrate de soude est réparti par par 40 cc. dans des tubes à essais et dans des flacons d'ERLENMEYER de 250 cc.

J'ensemence soit avec du *B. subtilis*, soit avec du *mesentericus ruber*. Les tubes sont maintenus droits. Les cultures sont faites à 30°. Au bout de trois jours, il n'y a plus ni azote nitrique ni azote nitreux dans les flacons. Dans les tubes la dénitrification n'est pas terminée au bout d'un mois.

Dans cet essai il n'y a pas eu formation de nitrites. Mais quelquefois, suivant la composition du bouillon, suivant la réaction primitive du milieu, des nitrites se forment et dans ces conditions la dénitrification, qui s'effectue néanmoins est beaucoup plus lente.

Si la réduction des nitrates ne se fait pas pour suppléer au manque d'oxygène libre, elle doit s'effectuer pour assurer la nutrition azotée des microbes.

Pour vérifier ce fait j'ai employé un milieu minéral dont la composition sera donnée dans la deuxième partie de ce travail et qui contient comme unique source d'azote 5 grammes de nitrate de soude par litre. Il est additionné de 4 à 3 o/o de saccharose. Je répartis ce milieu par 50 cc. dans des flacons d'ERLENMEYER de 250 cc. La dénitrification est moins rapide qu'en présence de bouillon de haricots car le développement est plus lent. Mais par contre elle est beaucoup plus régulière. Elle est terminée en cinq jours environ et il ne se forme pas de nitrites.

L'acide azotique passe à l'état d'azote ammoniacal puis à l'état d'azote organique.

Dans le tableau suivant j'ai indiqué les résultats que j'ai obtenus dans un tel milieu minéral sucré avec le *B. subtilis*. Les chiffres sont exprimés en milligrammes d'azote pour 100 cc. de culture. Au moment de l'analyse la dénitrification était complète. L'azote total est dosé par la méthode de KJELDAHL. L'azote ammoniacal par distillation en présence de magnésie et l'azote organique est obtenu par différence.

	Avant fermentation	Après fermentation	Différences
Azote total	82,44	82,94	+ 0,50
Azote nitrique . . .	82,44	0,00	— 82,44
Azote nitreux	0,00	0,00	0,00
Azote ammoniacal. . .	0,00	58,66	+ 58,66
Azote organique . . .	0,00	24,28	+ 24,28

L'assimilation de l'azote nitrique est ici des plus nettes : 100 o/o de l'azote nitrique a été réduit ; 71 p/o transformé en azote ammoniacal et 29 o/o assimilé et transformé en azote organique. La dénitrification a donc bien été un processus de digestion.

J'ai obtenu des résultats analogues avec les nitrates de potassium et de calcium.

Mais, pour que cette digestion soit possible il faut que simultanément à la réduction de l'azote nitrique se produise l'oxydation d'une matière carbonée. J'ai surtout employé le saccharose et le glucose.

Ces hydrates de carbone subissent des transformations chimiques dont l'étude fera l'objet de la seconde partie de ce travail ; mais il en est une qui ne se produit pas dans la plupart des milieux non nitrés et que je signalerai ici.

Des milieux sucrés additionnés de nitrate de soude à 0,1 ; 0,5 et surtout 1 o/o, puisensemencés avec le *B. subtilis*, deviennent peu à peu filants et lorsque la dénitrification est terminée la viscosité des cultures est très nette.

L'alcool absolu donne un coagulum qui lavé, à l'alcool à 90° à plusieurs reprises, chauffé dans l'alcool bouillant à 90°, est soluble dans l'eau. Cette solution ne réduit pas la liqueur de FEHLING, mais traitée par l'acide chlorhydrique étendu, au bain-marie à 100°, elle devient réductrice et donne avec la phénylhydrazine en milieu acétique une osazone ayant les caractères morphologiques de la glucosazone. Il y a donc eu au cours de la dénitrification formation d'une substance qui semble se rapprocher des gommés.

En même temps, la réduction au nitrate provoque une alcalinisation intense de la culture : l'ammoniaque formée et la soude libérée donnent des carbonates. L'alcalinité ainsi obtenue est difficile à mesurer exactement mais néanmoins on peut dire que dans un milieu contenant 1 o/o de nitrate de soude, la culture après dénitrification complète est aussi alcaline ou plutôt un peu plus alcaline qu'une solution décinormale.

La formation de la gomme et l'alcalinisation sont très vraisemblablement liées l'une à l'autre.

Je résumerai les résultats que j'ai obtenus dans l'étude de la dénitrification par certains microbes du groupe du *B. subtilis*, dans les conclusions suivantes :

1° Ces microbes ont des dénitrifiants énergiques qui transforment rapidement et complètement l'azote nitrique en azote ammoniacal et en azote organique. Les nitrites, termes intermédiaires nécessaires, n'apparaissent qu'accidentellement dans des conditions culturales défectueuses.

2° L'oxygène des nitrates est utilisé pour oxyder les matières organiques ternaires du milieu : c'est là une réaction nécessaire pour que la dénitrification ait lieu. Mais c'est un moyen, ce n'est pas un but. En effet cet oxygène ne peut remplacer l'oxygène libre qui est absolument indispensable à la vie de ces microbes.

3° La réduction des nitrates est le processus de digestion de l'azote nitrique par ces bactéries. Toute condition qui favorise leur développement, favorise par cela même la dénitrification. C'est ainsi que ce phénomène est activé par une aération intense.

Ces conclusions confirment en tous points les résultats qu'avait obtenus M. MAZÉ avec d'autres organismes (13).

4° Ces organismes dénitrifient chaque fois qu'ils trouvent simultanément des nitrates, de la matière organique oxydable et de l'air. Or dans les lits bactériens percolateurs, où ainsi que je l'ai démontré, ces microbes sont en général dominants, ils ont à leur disposition de l'azote nitrique, de la matière organique et de l'oxygène. Il y aura donc nécessairement dénitrification.

D'autre part, la nitrification, d'après les observations récentes de MM. MUNTZ et LAINÉ (2) et de STEVENS et WITHERS (3) peut parfaitement, dans la nature, se produire en présence de matières organiques

Donc dans les lits percolateurs où ces bactéries existeront, les deux phénomènes inverses de nitrification et de dénitrifi-

cation auront lieu simultanément et l'azote sera tantôt oxydé et tantôt réduit. Mais sa réduction exige la combustion de la matière organique et celle-ci venant à manquer, la nitrification apparaîtra dans toute son intensité et les nitrates s'accumuleront dans les eaux épurées.

DEUXIÈME PARTIE

NUTRITION CARBONÉE. ASSIMILATION DU SACCHAROSE

Les microbes du groupe du *B. subtilis* attaquent presque toutes les matières organiques ternaires qu'ils oxydent avec une grande rapidité : alcools simples ou complexes les plus divers, composés aldéhydiques ou acétoniques, hydrates de carbone, polysaccharides, matières amylacées, presque tous les acides organiques à l'état de sels.

Il convient de signaler cependant le cas du lactose qui n'est pas attaqué par la plupart de ces bacilles.

L'intensité même de ces phénomènes de combustion est intéressante au point de vue général car elle assigne à ces bactéries un rôle important dans les processus de dégradation et de minéralisation des matières organiques ternaires. Mais j'ai observé en outre, que cette oxydation, bien qu'active n'est pas brutale comme celle que provoquent certaines moisissures. Elle est graduelle et avant que la combustion ne soit totale il est facile de mettre en évidence quelques produits intermédiaires qui permettent d'entrevoir le mécanisme chimique de cette réaction.

J'ai étudié particulièrement l'action de ces bactéries sur le saccharose et c'est l'exposé des résultats que j'ai obtenus qui constituera la seconde partie de ce travail.

CHAPITRE PREMIER

Historique

Très souvent on a pensé que l'oxydation du sucre par le *B. subtilis* ou les microbes voisins du même groupe, était une combustion totale donnant exclusivement de l'eau et de l'acide carbonique.

En 1884 VANDEVELDE (16) signale que s'il prive d'air une culture du *B. subtilis* en milieu sucré, il y a fermentation et production d'acide lactique, d'acides gras, d'acide carbonique et d'hydrogène. La présence de ce dernier gaz montre nettement que d'autres bactéries étaient associées au *B. subtilis*. Ce microbe est en effet incapable de dégager de l'hydrogène, comme je m'en suis assuré à de nombreuses reprises.

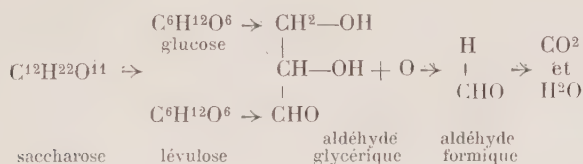
Le premier travail précis sur le mécanisme de la combustion des matières ternaires et en particulier du saccharose par le *B. subtilis* et quelques microbes analogues, est dû à PÉRÉ. (17). Je ne rappellerai de cette étude que ce qui concerne l'assimilation au saccharose.

PÉRÉ cultive à 34-35° en milieu minéral sucré, le *Tyrophrix tenuis* de DUCLAUX, le *B. subtilis* et le *B. mesentericus vulgaris*. Il constate que le sucre est interverti : l'oxydation porte sur le lévulose et le glucosé mais inégalement. Le *B. mesentericus* et le *T. tenuis* attaquent plus vite le lévulose que le dextrose tandis que le *B. subtilis* fait disparaître le lévulose plus rapidement que son isomère.

En outre PÉRÉ observe que les cultures distillées donnent un distillat lévogyre, capable de réduire la liqueur de FEHLING, de se combiner à la phénylhydrazine mais incapable de recolorer la fuschine décolorée par le bisulfite de sodium, Il attribue ces propriétés du distillat à la présence d'un composé aldéhydique complexe qu'il identifie, par l'étude des produits de réduction et d'oxydation, à l'aldéhyde glycérique $\text{CH}^2\text{OH}—\text{CH.OH}—\text{CHO}$.

PÉRÉ remarque que ce produit augmente peu à peu, atteint un maximum, décroît puis disparaît et que le distillat des cultures âgées contient un aldéhyde simple qui recolor la fuschine décolorée au bisulfite. Il l'identifie à l'aldéhyde formique. Cet aldéhyde est oxydé à son tour par le microbe qui le fait disparaître.

On peut résumer la conception que PÉRÉ s'était faite du processus de combustion du sucre par les microbes du groupe du *B. subtilis* par le schéma suivant.



En 1904 DESMOTS reprend cette question (18). Il vérifie les faits signalés par PÉRÉ mais leur donne toute autre signification. En 1901 GRIMBERT (19) avait signalé la présence de l'acétylméthylcarbinol dans les cultures en milieu sucré au *B. tartaricus*. DESMOTS attribue le pouvoir réducteur et rotatoire du distillat des cultures des bactéries du groupe du *subtilis* à la présence de ce composé acétonique en C^4 .

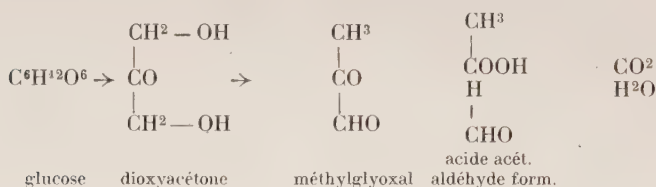


En outre DESMOTS constate la formation d'alcool éthylique, d'acide valérianique, d'acide acétique et confirme celle d'aldéhyde formique dans les cultures âgées. Cet auteur apporte donc des faits nouveaux intéressants mais malheureusement

ne donne aucun renseignement quantitatif et il est impossible, après ce travail de se faire une idée du processus de la combustion du saccharose par ces bactéries.

En 1910 M. FERNBACH s'occupe de la dégradation des hydrates de carbone par le *Tyrophrix tenuis* de DUCLAUX (20). Il ne trouve pas d'aldéhyde glycérique mais par contre observe la présence de dioxyacétone $\text{CH}_2\text{—}(\text{OH})\text{—CO—CH}_2\text{—}(\text{OH})$ et dans le distillat celles de méthylglyoxal $\text{CH}_3\text{—CO—CHO}$, d'aldéhyde formique et d'acide acétique.

D'après cet auteur le glucose est dédoublé en dioxyacétone d'où proviennent tous les autres produits de la culture.



En 1912 MM. HARDEN et NORRIS abordent l'étude de la combustion du saccharose par le *Tyrophrix tenuis*. Il ne signalent aucun fait nouveau mais confirment les résultats obtenus par DESMOTS au sujet de la formation de l'acétylméthylcarbinol (21) et ceux obtenus par M. FERNBACH en ce qui concerne l'aldéhyde glycérique.

En résumé les divers travaux qui ont été faits sur la combustion du saccharose par les bactéries du groupe du *B. subtilis* en culture pure, ont mis en évidence la présence de produits assez variés. Certains de ces composés ont été caractérisés par plusieurs auteurs : c'est le cas de l'acétylméthylcarbinol, de l'aldéhyde formique, de l'acide acétique et de l'acide valériannique. D'autres n'ont été observés que par un expérimentateur : ce sont l'alcool éthylique, la dioxyacétone, le méthylglyoxal. Enfin la formation de l'aldéhyde glycérique signalée par PÉRÉ a été contestée par M. FERNBACH puis par MM. HARDEN et NORRIS.

Donc actuellement on peut dire que nous connaissons net-

tement certains produits de cette oxydation du glucose mais qu'il y a doute pour quelques autres. En outre il est impossible de saisir les liens qui les rattachent les uns aux autres. Nous n'avons pour cela aucune expérience, aucune donnée quantitative.

La théorie de PÉRÉ était simple et s'appuyait sur un travail important. Les travaux de MM. DESMOTS et FERNBACH ont montré qu'elle était tout au moins incomplète.

Celle de M. FERNBACH qui tend à expliquer le mécanisme de la fermentation alcoolique ne tient pas compte d'un corps à quatre atomes de carbone, l'acétylméthylcarbinol.

Vérifier la présence des produits signalés par les divers auteurs dans les cultures en milieu sucré des bactéries du groupe du *B. subtilis*, rechercher s'il n'en existe pas d'autres, essayer de coordonner tous les résultats, tel est le but que je me suis proposé.

CHAPITRE II

Respiration du “*B. subtilis*” en milieu sucré

Dans les travaux concernant les fermentations, l'étude des échanges gazeux devrait tenir une grande place. Elle est souvent négligée quand on s'occupe des combustions effectuées par des microbes aérobies. Souvent aussi les méthodes employées ne sont pas suffisamment rigoureuses parce que les volumes de gaz absorbés ou dégagés sont trop faibles.

J'ai pensé que dans le cas de la combustion du saccharose par le *B. subtilis*, il pouvait être intéressant de suivre avec soin les échanges gazeux et les variations du quotient respiratoire $\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$. Ce rapport permet en effet dans bien des cas de prévoir la nature et la quantité des produits qui sont formés au cours de la respiration quand on sait qu'elle est la substance qui subit la combustion, et de se faire ainsi une idée générale de la nature du phénomène.

J'exposerai successivement :

- 1° Les méthodes employées ;
- 2° Les résultats obtenus ;
- 3° Les conclusions que l'on peut en tirer.

I

Méthodes expérimentales. — Je cultive le microbe que je veux étudier, dans une quantité exactement mesurée de bouil-

lon sucré, en atmosphère confinée à une température de 29-30°.

L'analyse de l'atmosphère finale, me permet d'évaluer l'oxygène absorbé et l'acide carbonique dégagé.

J'emploie comme milieu de culture soit du bouillon de haricots additionné de nitrate de soude, soit un milieu minéral dont la composition est la suivante :

Sulfate de magnésium.	0,100
Phosphate bipotassique.	0,250
Chlorure de potassium.	0,200
Chlorure de manganèse	0,012
Sulfate de fer	0,025
Eau de source	1.000 cc.

Ce milieu est additionné de 5 grammes de peptone CHAPOTEAUT et de 40 grammes de saccharose, puis légèrement alcalinisé avec un peu de soude. J'avais préparé ce bouillon en assez grande quantité et réparti en flacons, qui après stérilisation furent bouchés aseptiquement, paraffinés puis conservés. Le même milieu m'a donc servi pour presque tous mes essais.

Les cultures sont faites dans des ballons de 1 ou de 3 litres, bouchés par un bouchon de caoutchouc à deux trous dans lesquels passent deux tubes de verre. L'un plonge dans le milieu du ballon et est destiné à l'introduction de l'acide sulfurique dilué au moment de l'analyse ; l'autre s'arrête dans le col et est séparé de la culture par un tampon de coton stérile ; il permet d'extraire ou d'introduire du gaz aseptiquement. Ces tubulures sont bouchées à leur partie supérieure par des caoutchoucs munis d'obturateurs en verre. Tout le système, bouchons et tubes, est stérilisé à l'autoclave.

Après avoir ensemencé le bouillon avec la bactérie que je veux étudier, j'adapte aseptiquement le bouchon et ses tubulures au col du ballon, je verse un peu de paraffine stérile et je recouvre tous les joints d'une couche de mercure. Dans ces conditions aucun échange d'air n'est possible. Je mets les bal-

lons à l'étuve à 29-30°. J'ai vérifié plusieurs fois ou je n'ai pas eu à faire l'analyse, la pureté des cultures.

Méthodes analytiques. — Les gaz sont extraits à la pompe à mercure et recueillis dans un volumètre d'une capacité de 1.949 cc. 55 à 15°. Aussi pour les ballons de 3 litres faut-il deux extractions successives. Vers la fin, on introduit dans la culture par l'une des tubulures de l'acide sulfurique dilué au tiers en ayant soin de ne point faire rentrer d'air. Le ballon est mis au bain-marie dans l'eau chaude. Dans ces conditions tous les gaz peuvent être extraits.

Le volume en est mesuré dans le volumètre et ramené à 0° et 760 mm. en tenant compte des corrections dues à la tension de la vapeur d'eau et de la dilatation des colonnes mercurielles du manomètre et du baromètre.

Une partie du gaz est analysée dans l'eudiomètre. Le gaz carbonique est dosé par absorption par la potasse dans la pipette de DOYÈRE et l'oxygène par combustion avec de l'hydrogène en excès. Je recherche l'hydrogène par combustion avec un excès d'oxygène et le protoxyde d'azote par combustion avec l'hydrogène après absorption de l'oxygène par le pyrogallate alcalin.

Je détermine ainsi les volumes à 0° et 760 mm. de gaz carbonique d'oxygène et d'azote qui existent dans la culture. Je n'ai jamais trouvé ni hydrogène ni protoxyde d'azote. Les expériences que j'ai exposées dans la première partie de ce travail m'ont indiqué que ces microbes ne dégagent ni n'absorbent d'azote à l'état gazeux. Je puis donc déduire de la quantité d'azote trouvée à l'analyse la quantité d'air primitivement emprisonné dans le ballon. Il est alors facile de calculer l'oxygène absorbé et d'obtenir le rapport $\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$.

Dans certains essais cette technique a dû être un peu compliquée. L'oxygène est en effet très vite absorbé et il y a intérêt à renouveler l'air au cours de la culture.

Je fais donc une première extraction mais incomplète, et sans introduire d'acide sulfurique. Les gaz extraits sont mesu-

rés et analysés. Je laisse lentement rentrer de l'air dans le ballon où il y a un vide partiel mais je referme la tubulure avant que l'équilibre des pressions ne soit fait. L'air, filtrant sur le coton est stérile. La culture est remise à l'étuve et après quelques jours j'effectue l'analyse définitive. Les résultats ainsi obtenus sont additionnés. Cette méthode est un peu longue mais rigoureuse au point de vue analytique.

II

EXPÉRIENCES EN MILIEUX NITRATÉS AVEC LE « BACILLUS SUBTILIS »

Le milieu de culture est du bouillon de haricots additionné de 4 o/o de saccharose et de 1 o/o de nitrate de soude.

Le ballon d'une capacité d'un litre environ contient 50 cc. de bouillon. Je fais un vide partiel pour que l'acide carbonique provenant de l'oxygène du nitrate ne fasse pas pression. A la fin de l'expérience, il n'y a plus ni azote nitrique ni azote nitreux.

		Expérience A	Expérience B
Durée en jours :		6	8
Volume d'air initial en cc.		524,70	547,20
Volume d'air final	—	984,50	988,78
Composition	{ N — O — CO² —	42,10	43,72
centésimale		0,18	0,00
de l'atmosphère		57,72	56,28
Composition	{ N — O — CO² —	414,50	432,30
absolue		1,75	0,00
		568,25	556,48

Il n'y a ni hydrogène ni protoxyde d'azote.

Dans les calculs l'oxygène du nitrate a été ajouté à celui de l'atmosphère.

Expériences	Oxygène absorbé en cc.	Acide carbonique dégagé en cc.	CO ² O ²
—	—	—	—
A	305,65	568,25	1,85
B	312,10	556,48	1,78
Lemoigne			3

EXPÉRIENCES EN MILIEUX PEPTONÉS

Le ballon d'une capacité de 3 litres environ contient 50 cc. de milieu minéral peptoné à 0,5 o/o et additionné de 4 o/o de saccharose.

Le tableau suivant contient les données fournies par l'analyse, de trois cultures d'âges différents.

Age de la culture : jours			I 2	II 6	III 12	
1 ^{re} Portion	Volume d'air	cc.	1.460,68	1.899,70	1.457,33	
	Composition centésimale	N	—	76,47	73,02	72,39
		O	—	15,57	4,78	0,00
		CO ²	—	7,96	22,20	27,61
	Composition absolue	N	—	1.116,99	1.387,16	1.054,93
		O	—	227,43	90,81	0,00
CO ²		—	116,26	421,73	402,40	
2 ^e Portion	Volume d'air	—	1.657,44	1.337,20	1.496,31	
	Composition centésimale	N	—	79,91	72,27	72,07
		O	—	15,45	4,20	0,00
		CO ²	—	8,64	23,53	27,93
	Composition absolue	N	—	1.258,17	966,40	1.078,29
		O	—	256,07	56,16	0,00
CO ²		—	143,20	314,64	418,02	
Totaux	Volume d'air	—	3.118,12	3.236,90	2.953,64	
	Composition absolue	N	—	2.375,16	2.353,56	2.133,22
		O	—	483,50	146,97	0,00
		CO ²	—	259,46	736,37	820,42
Volume d'air initial			—	3.006,52	2.979,18	2.700,27

De ces données on déduit les résultats suivants :

	Durée	Oxygène absorbé	Acide carbonique dégagé	Rapport $\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$
	jours	cc.	cc.	
I	2	147,86	259,46	1,75
II	6	478,65	736,37	1,53
III	12	567,05	820,42	1,45

Dans aucune de ces analyses je n'ai trouvé d'hydrogène. Dès le 6^e jour la teneur en oxygène de l'atmosphère du ballon est très faible et il est probable que dans ces conditions les phénomènes d'oxydation subissent une perturbation importante.

Aussi ai-je fait de nouveaux essais, dans les mêmes conditions mais avec 25 cc. de bouillon au lieu de 50 cc. et dans l'expérience la plus longue j'ai renouvelé l'atmosphère du ballon comme je l'ai indiqué précédemment.

Les données suivantes se rapportent à 25 cc. de bouillon :

		Age de la culture :		I	II			
		jours		5	14			
1 ^{re} Analyse	Après 5 jours	Volume d'air		cc.	»	1.732,00		
		Composition centésimale	{	N	—	»	78,83	
				O	—	»	17,14	
				CO ²	—	»	4,03	
		Composition absolue	{	N	—	»	1 365,30	
				O	—	»	296,87	
				CO ²	—	»	69,80	
	Volume d'air		—	1.805,80	1.663,00			
	Analyse définitive	1 ^{re} Portion	Composition centésimale	{	N	—	76,98	79,70
					O	—	16,18	14 55
CO ²					—	6,84	5,75	
Composition absolue			{	N	—	1.390,10	1 325,4	
				O	—	292,18	241,97	
				CO ²	—	123,52	95,62	
Volume d'air		—	1.227,30	1 023,90				
2 ^e Portion		Composition centésimale	{	N	—	76,31	79,21	
				O	—	16,80	14,40	
				CO ²	—	6,89	6,39	
	Composition absolue	{	N	—	936,50	811,03		
			O	—	206,18	147,44		
			CO ²	—	84,62	65,43		
Totaux	Volume d'air		—	3.033,10	4 418,87			
	Composition absolue	{	N	—	2.326,60	3.501,74		
			O	—	498,36	686,28		
			CO ²	—	208,14	230,85		
Volume d'air initial		—	2 945,06	4.432,74				

Dans aucune de ces analyses je n'ai trouvé d'hydrogène.

De ces données on déduit les résultats suivants :

	Durée	Oxygène absorbé	Acide carbonique dégagé	Rapport CO ² O ₂
	—	—	—	—
	jours	cc.	cc.	
I	5	120,10	208,14	1,73
II	14	244,72	230,85	0,94

J'ai fait d'autres cultures où au contraire l'oxygène a manqué très rapidement.

Expérience. — Milieu minéral peptoné et sucré à 4 o/o. Le ballon de 1 litre environ contenait 50 cc. de bouillon étalé sur une large surface et par suite sous une faible épaisseur. L'analyse a été faite après 5 jours.

Volume d'air	cc.	1.278,45
Composition centésimale	N	67,95
	O ^a	0,00
	CO ²	32,05
Composition absolue	N	868,65
	O ²	0,00
	CO ²	409,80
Volume d'air initial	—	1 278,45

Je n'ai pas trouvé d'hydrogène dans cette analyse.

De ces données on déduit les résultats suivants :

Oxygène absorbé	Acide carbonique dégagé	Rapport $\frac{CO^2}{O^2}$
—	—	—
cc.	cc.	
230,90	409,00	1,77

J'ai essayé d'augmenter encore la valeur du quotient respiratoire en arrêtant l'oxydation plus rapidement.

Expérience.— 100 cc. du même bouillon sont mis dans un ballon de 1 litre environ, dans lequel je fais un vide partiel à la trompe à eau après avoirensemencé Je fais l'analyse après trois jours.

Volume d'air	cc.	430,40
Composition centésimale	N	62,99
	O	0,00
	CO ²	37,01
Composition absolue	N	271,12
	O	0,00
	CO ²	159,28
Volume d'air initial	—	343,18

D'où l'on tire :

Oxygène absorbé	cc.	72,06
Acide carbonique dégagé .	—	159,28
Rapport $\frac{CO^2}{O^2}$	—	2,21

Dans cet essai, par suite de la faible pression, il y avait formation de nombreuses bulles de gaz comme dans une fermentation.

Dans toutes ces expériences j'ai employé la peptone du CHAPOTEAUT comme aliment azoté. Il y a lieu de rechercher quels sont les échanges gazeux et quelle est la valeur du quotient respiratoire, lorsque la combustion porte exclusivement sur cette matière azotée.

Expérience — Dans cet essai j'ai ensemencé avec le *B. subtilis* du bouillon minéral peptoné identique à celui des expériences précédentes, mais dans lequel je n'ai pas ajouté de saccharose. La peptone CHAPOTEAUT est donc la seule matière organique.

Je mets 50 cc. de ce bouillon dans un ballon d'un litre environ.

Durée en jours :		5
Volume d'air	cc.	1.133,00
Composition centésimale	{ N	— 79,43
	{ O	— 16,93
	{ CO ²	— 3,64
Composition absolue	{ N	— 899,94
	{ O	— 191,81
	{ CO ²	— 41,25
Volume d'air initial	—	1.139,12

D'où l'on tire :

Oxygène absorbé	cc.	47,41
Acide carbonique dégagé	—	41,25
Rapport $\frac{CO^2}{O^2}$	—	0,87

A ces données analytiques, j'ajouterai les faits suivants : Si l'on bouche un flacon contenant une culture de *B. subtilis* ou de *B. mesentericus ruber*, en milieu sucré, il y a pression à l'intérieur de ce vase et souvent cette pression est suffisante pour faire sauter le bouchon ou casser le flacon : c'est ce qui m'est arrivé à plusieurs reprises avec les matras FERNBACH.

III

Ce qui tout d'abord attire l'attention lorsque l'on examine

ces chiffres, c'est l'intensité même des échanges gazeux provoqués par le *B. subtilis* en milieu sucré. Ce fait est intéressant car il montre nettement que ce microbe et les microbes analogues peuvent jouer un grand rôle dans les phénomènes de combustion des matières hydrocarbonées qui se produisent dans le sol et au cours de l'épuration bactérienne des eaux d'égouts. Mais l'énergie comburante de ces bactéries vis-à-vis des hydrates de carbone est depuis longtemps connue et a été constatée et étudiée par d'autres méthodes analytiques.

Je n'ai trouvé au contraire aucun renseignement sur la valeur du quotient respiratoire $\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$ pendant la combustion du saccharose par le *B. subtilis* ou par les microbes du même groupe. Or on voit qu'au début ce rapport est élevé puisqu'il dépasse l'unité et atteint les valeurs de 1,75; 1,80; 1,73; 1,77 et peut même, si l'on arrête les phénomènes d'oxydation, arriver jusqu'à 2,21. Peu à peu il baisse, tend vers un et si la richesse de l'atmosphère en oxygène n'est pas trop faible il devient inférieur à l'unité (0,93). Il est d'ailleurs possible qu'il soit capable de descendre au-dessous de 0,93, car dans l'expérience où j'ai obtenu ce chiffre, l'atmosphère était moins riche en oxygène que l'air et les phénomènes d'oxydation étaient peut-être par cela même déjà un peu ralentis.

Examinons tout d'abord pourquoi, au début, le quotient respiratoire est supérieur à l'unité. Remarquons que sa valeur est bien liée à l'utilisation du saccharose par le microbe. En effet dans les expériences en milieux nitrates, le sucre est l'unique matière organique du milieu, et les cultures du *B. subtilis* en bouillon peptoné non sucré, ont montré que la combustion biologique de la peptone donne un quotient respiratoire inférieur à l'unité.

Or la formule de combustion totale du glucose exige pour le rapport $\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$ une valeur égale à 1.



Donc quand, au cours de l'oxydation du sucre par le *B. sub-*

tilis, ce rapport est supérieur à l'unité, c'est-à-dire lorsque la quantité d'oxygène absorbé est plus faible que celle qui est dégagée sous forme d'acide carbonique, il faut nécessairement qu'une partie de ce gaz carbonique provienne de la dislocation de la molécule hydrocarbonée et qu'il se forme d'autre part un ou des produits moins oxygénés que le glucose.

Donc, au début, cet hydrate de carbone subit, sous l'influence du *B. subtilis*, un dédoublement qui donne un produit très oxydé, l'anhydride carbonique, et un ou des produits réduits. Les phénomènes de dislocation l'emportent donc sur ceux d'oxydation. Avant la combustion, il y a fermentation.

Lorsque, par la suite, le quotient respiratoire baisse et tend vers l'unité, c'est qu'il y a oxydation des produits préalablement formés.

Enfin quand ce rapport $\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$ devient inférieur à 1, c'est qu'il y a, d'une part, peut-être combustion de la matière azotée primitive et d'autre part probablement formation d'un ou plusieurs produits plus oxygénés que le glucose et autres que l'acide carbonique. Les phénomènes de combustion l'emportent alors sur ceux de fermentation.

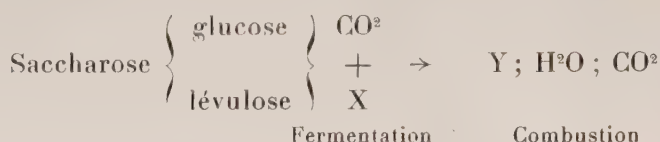
Ces résultats donnés par l'étude des échanges gazeux et des variations du quotient respiratoire sont intéressants, car tout d'abord ils nous indiquent la formation nécessaire au cours de la combustion du glucose par le *B. subtilis* et les microbes analogues, de produits intermédiaires, les uns plus réduits, les autres plus oxydés que le sucre et précisent ainsi l'orientation que doivent prendre les recherches analytiques.

Mais, d'autre part, ces résultats me permettent dès maintenant, même dans l'ignorance complète de la nature de ces composés transitoires, de donner un schéma général de l'assimilation du glucose par les bactéries du groupe du *B. subtilis*.

Dans une première phase, cet hydrate est dédoublé en anhydride carbonique et en corps X plus réduits que le sucre : il y a dislocation de la molécule, il y a fermentation.

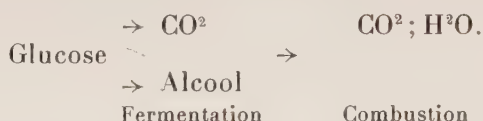
Dans une seconde phase, ces composés sont oxydés et don-

nent de l'eau et des corps Y plus oxydés que la dextrose. La fermentation est suivie d'une combustion



Ce schéma est vague, mais néanmoins dès maintenant il permet de rapprocher la combustion au sucre par le *B. subtilis* d'autres fermentations et notamment de la fermentation alcoolique.

En effet, la fermentation alcoolique, telle qu'on l'observe en vie anaérobie n'est que le premier stade de l'assimilation du glucose ainsi que M. MAZÉ l'a démontré (22).



Mais, en général, sauf dans le cas de l'*Eurotiopsis Gayoni* qui sécrète sa zymase pendant la vie aérobie et non à l'abri de l'oxygène (23), il faut des artifices pour faire apparaître l'alcool et en vie strictement aérobie on ne voit pas directement que l'oxydation est précédée d'une fermentation et que de l'acide carbonique se dégage sans qu'il y ait, simultanément, absorption d'oxygène. Dans le cas du *B. subtilis* au contraire, ces faits deviennent évidents sans qu'il soit nécessaire de gêner en quoi que ce soit la vie du microbe qui fait fermenter le sucre en vie strictement aérobie comme l'*Eurotiopsis Gayoni*.

Dans la suite de ce travail, je vais m'attacher à préciser les phénomènes qui se produisent dans la première phase de l'assimilation du glucose par le *B. subtilis* et microbes voisins, c'est-à-dire que je vais rechercher quels sont les produits de fermentation que cet hydrate de carbone produit sous l'influence de ces bactéries.

CHAPITRE III

Produits de la fermentation

Dans le chapitre précédent j'ai démontré qu'il devait y avoir dans les cultures du *B. subtilis* en milieu sucré, formation de produits plus réduits que le glucose. Je vais dans le chapitre présent rechercher la nature de ces substances.

Les divers composés signalés dans les cultures peuvent se classer, d'après leur teneur en oxygène, dans l'ordre suivant :

	Formule	Oxygène o/o
Acide valérianique.	$C^5H^{10}O^2$	31,37
Alcool éthylique.	C^2H^6O	34,78
Acétylméthylcarbinol	$C^4H^8O^2$	36,36
Méthylglyoxal	$C^3H^4O^2$	44,44
Acide acétique	$C^2H^4O^2$	53,33
Aldéhyde glycérique	$C^3H^6O^3$	53,33
Dioxyacétone.	$C^3H^4O^3$	53,33
Aldéhyde formique	CH^2O	53,33

J'ajouterai le glucose à titre de comparaison :

Glucose.	$C^6H^{12}O^6$	53,33
------------------	----------------	-------

Les quatre premiers composés sont moins oxygènes que le sucre, les autres ont la même composition centésimale que lui, aucun n'est plus oxygéné. Je vais rechercher tout d'abord si l'acide valérianique, l'alcool éthylique, l'acétylméthylcarbi-

nol et le méthylglyoxal existent et peuvent expliquer la valeur du quotient $\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$ pendant la combustion du sucre par le *B. subtilis*, puis j'examinerai s'il n'y a pas d'autres produits plus réduits que le glucose et en ce cas qu'elle est la nature de ces composés.

I

Dans ce premier paragraphe je m'occuperai de l'acide valérianique, de l'alcool éthylique et du méthylglyoxal.

La production de l'acide valérianique par les microbes du groupe du *B. subtilis* est constante. Signalée par DUCLAUX (10) DEHERAIN et DUPONT (12) elle fut encore constatée par DESMOTS (18) et je l'ai moi-même vérifiée un grand nombre de fois.

Je n'ai pas, pour l'instant, à m'inquiéter de l'origine de cet acide gras. Il me suffit de constater que, par suite de la composition centésimale, sa formation peut influer sur la valeur du quotient respiratoire et de rechercher en quelle mesure elle peut élever ce rapport $\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$. Une culture de *B. subtilis* faite dans 25 cc. de bouillon minéral peptoné et sucré à 4 o/o, a provoqué après 5 jours une absorption de 120 cc. 10 d'oxygène et un dégagement de 208 cc. 14 d'acide carbonique. L'excès d'oxygène dégagé sous forme d'acide carbonique était donc de 208,14-120,10 soit 88 cc. 04 ou 125 milligr. 84. Dans le même temps, 500 cc. du même milieu, cultivés avec le même microbe, ont donné 16 milligrammes d'acide valérianique. Ce sont là des quantités négligeables par rapport à la quantité d'oxygène dégagé en excès sous forme d'acide carbonique dans les mêmes conditions et par suite la production d'acide valérianique ne peut expliquer les valeurs que j'ai trouvées pour le quotient respiratoire

La présence de l'alcool éthylique dans les cultures en milieux sucrés du *B. subtilis*, du *B. mesentericus* et du *Tyrophrix tenuis* a été signalée par DESMOTS (18) sans que d'ailleurs cet

auteur ait donné d'indications sur la méthode analytique qu'il a employée. La recherche de cet alcool dans le distillat des cultures du *B. subtilis* ou microbes analogues est très difficile car ces bactéries provoquent la formation de substances volatiles qui donnent la plupart des réactions dont on se sert pour le caractériser en général (production d'iodoforme, réduction du bichromate).

Je l'ai recherché à plusieurs reprises, après plusieurs rectifications, en déterminant la densité et en faisant les éthers acétiques et butyriques en milieu sulfurique. Au cours des rectifications il y a toujours altération des produits volatils du distillat et formation de composés aldéhydiques recolorant la fuchsine décolorée par le bisulfite de soude. Les résultats furent nettement négatifs ou quelquefois douteux.

Donc les cultures du *B. subtilis* et des microbes voisins en milieu sucré et en conditions aérobies ne donnent pas d'alcool éthylique ou n'en donnent que des traces extrêmement petites qui ne peuvent influer sur la valeur du quotient respiratoire.

La présence du méthylglyoxal $\text{CH}^3\text{—CO—CHO}$ dans les distillats des cultures du *T. tenuis* en milieux contenant de l'amidon du sucre ou de la glycérine, a été signalée par M. FERNBACH (20). Cet auteur a caractérisé l'aldéhyde pyruvique par sa phénylosazone fusible à 144-145° et ses diverses réactions en particulier celles indiquées par DENIGÈS avec divers phénols et l'acide sulfurique (24).

La phénylosazone brute obtenue en traitant le distillat de la culture du *B. subtilis* par la phénylhydrazine en milieu acétique fond, avant toute purification et après dessiccation dans le vide à 235-240°. Il ne peut donc y avoir que peu de méthylglyoxal.

D'autre part cette cétone aldéhydique, malgré sa teneur en oxygène, ne peut, par sa formation, expliquer l'élévation de la valeur du quotient respiratoire.

L'aldéhyde pyruvique n'est en effet que de la dioxycétone déshydratée c'est-à-dire du glucose moins de l'eau



Sa formation ne peut donc pas provoquer un dégagement d'acide carbonique.

Donc, parmi les produits plus réduits que le glucose signalés dans les cultures des microbes du groupe du *B. subtilis*, ni l'acide valérianique, ni l'alcool éthylique, ni le méthylglyoxal ne peuvent expliquer les échanges gazeux que j'ai obtenus. Il reste à examiner maintenant le cas de l'acétylméthyl carbinol.

II

J'examinerai successivement :

1° Les méthodes employées pour caractériser l'acétylméthylcarbinol ;

2° Les procédés permettant de le doser ;

3° L'influence que peut avoir sa formation sur les échanges gazeux.

*
* *

Si l'on distille à la pression ordinaire ou dans le vide, en milieu neutre, légèrement acide ou légèrement alcalin, une culture de *B. subtilis* un autre microbe voisin, dans un bouillon sucré, on obtient un distillat lévogyre, réducteur incapable de recolorer la fuchsine décolorée par le bisulfite de soude.

Ces faits furent observés pour la première fois par PÉRE (17). Il les attribuait à la formation d'aldéhyde glycérique



Il caractérisait cet aldéhyde par ses produits de réduction, alcool isopropylique, alcool allylique et acétone et ses produits d'oxydation ; acide glycérique. Il traita le distillat par la phénylhydrazine mais ne fit pas l'étude des composés ainsi obtenus.

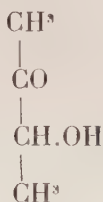
M. FERNBACH (20) a recherché l'aldéhyde glycérique dans

une culture de *Tyrothrix tenuis* par la réaction de la phloroglucine indiquée par WOHL et NEUBERG (25). Il a obtenu des résultats négatifs. J'ai refait cette épreuve à plusieurs reprises avec des cultures de *B. subtilis* et de *B. mesentericus* ruber et suis arrivé aux mêmes conclusions que M. FERNBACH.

D'ailleurs l'aldéhyde glycérique n'est pas volatile et par suite ne pouvait se trouver dans les distillats.

Donc les propriétés de ces distillats, mises en évidence par PÉRÉ, sont attribuables à la présence d'un corps autre que l'aldéhyde glycérique.

En 1905, DESMOTS montra que ce produit était l'acétylméthylcarbinol (18).



GRIMBERT l'avait découvert en 1901 dans les produits de fermentation du sucre par le *B. tartricus* (19).

DESMOTS se base pour le caractériser sur son pouvoir rotatoire, son pouvoir réducteur et surtout sur son osazone. Le distillat donne en effet une osazone qui fond à 243°. Comme celle du biacétyle $\text{CH}^3.\text{CO}.\text{CO}.\text{CH}^3$, et qui oxydée donne une tétrazone fusible après cristallisation dans l'alcool à 151° (GRIMBERT) (19).

HARDEN et NORRIS (21) ont confirmé purement et simplement les faits indiqués par DESMOTS.

Je les ai également souvent vérifiées et je ne donnerai que quelques détails nouveaux et quelques précisions. Le distillat que l'on obtient de ces cultures est très réducteur surtout en milieu alcalin et une réaction commode pour le constater est la réduction du bleu de méthylène en présence d'un peu de soude ou de potasse. La décoloration est presque instantanée. On avait observé ce fait depuis longtemps avec les cultures du *B. subtilis* et on l'attribuait au besoin d'oxygène de cet orga-

nisme. On peut l'expliquer par la formation d'acétylméthylcarbinol.

Une dissolution de cette cétone alcoolique conservée dans un flacon mal bouché, change peu à peu d'odeur et de couleur. D'incolore elle devient peu à peu jaune verdâtre et si elle est suffisamment concentrée devient nettement verte. Son pouvoir rotatoire diminue en même temps. Une solution qui après rectification dans l'acide carbonique avait un pouvoir rotatoire de $-4^{\circ}27'$ dans un tube de 4 dcm., n'a plus au bout d'une année qu'un pouvoir rotatoire de $-1^{\circ}46'$. Distillée elle donne un liquide qui passe avant la vapeur d'eau et dont l'odeur et la couleur verte sont caractéristique de biacétyle $\text{CH}^3.\text{CO}.\text{CO}.\text{CH}^3$. Il y a donc eu oxydation spontanée. Cette transformation peut être obtenue presque instantanément si l'on fait agir de l'eau de brome sur le distillat, soit au bain-marie à 100° ou même à 30° , soit au soleil ou à la lumière électrique. C'est là une action brutale qui détruit en partie le biacétyle formé, mais qui permet facilement de caractériser l'acétylméthylcarbinol.

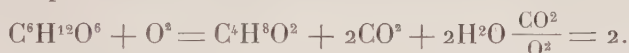
La production de la phénylosazone est très facile.

On obtient une osazone qui, lavée simplement à l'eau est jaune clair et fond, après dessiccation dans le vide et sur l'acide sulfurique, à 235° - 240° . Elle est très peu soluble dans l'alcool, l'éther et autres solvants. Purifiée par l'alcool elle fond à 243° - 244° . Mais cette osazone est très facilement oxydable lorsqu'elle est en solution ou imprégnée de solvants. Une solution de cette osazone dans l'éther-alcool mise dans un tube à essais, laisse tout d'abord déposer des cristaux incolores ou très légèrement jaunâtres et qui ont la forme de prismes très nets et plus ou moins allongés, assez souvent maclés. Peu à peu, la solution qui était jaune clair fonce et devient un peu rouge puis finalement rouge foncé. De nouveaux cristaux se forment alors en même temps que les prismes : ce sont de longues aiguilles feutrées, rouges. A la fin il n'y a plus de prismes et on ne recueille que des aiguilles qui sont les cristaux de la tétrazone du biacétyle. Cette oxydation qui

a été ici lente est rapide au contraire si la solution présente une large surface à l'air et il faut en tenir compte quand on effectue la purification de l'osazone sans quoi on risque d'obtenir un produit dont le point de fusion sera un peu au-dessous de 243°.

Traitée par l'acide chlorhydrique dilué à l'ébullition, cette phénylosazone donne à la rectification un liquide vert qui passe avant la vapeur d'eau et qui est le biacétyle.

Donc l'acétylméthylcarbinol est bien un des produits que l'on trouve dans les cultures du *B. subtilis*. Sa teneur en oxygène est moindre que celle du glucose et sa formation aux dépens de cet hydrate ou carbone entraîne un quotient respiratoire supérieur à l'unité



Donc la production de ce composé cétonique doit influencer sur les échanges respiratoires provoqués par le *B. subtilis*.

Pour savoir en quelle mesure il faut une méthode analytique qui permette d'obtenir des données quantitatives. C'est cette méthode que je vais maintenant exposer.

..

PÉRÉ qui ignorait la nature de ce corps le dosait par le pouvoir rotatoire du distillat. Il n'obtenait ainsi que des chiffres ayant une valeur relative.

DESMOTS pesait l'osazone. Mais dans le distillat il n'avait pas la totalité de l'acétylméthylcarbinol et de plus la préparation de l'osazone et sa purification se prêtent mal à un dosage précis.

Pour doser cette cétone alcoolique il faut :

1° Pouvoir déterminer la richesse d'une solution en ce corps ;

2° Pouvoir extraire des cultures la totalité de ce produit.

Je vais examiner successivement ces deux problèmes :

1° DOSAGE DE L'ACÉTYLMÉTHYLCARBINOL EN SOLUTION. — Parmi

les réactions diverses que présente l'acétylméthylcarbinol, trois permettent de faire facilement des essais quantitatifs. Ce sont :

α) *Le pouvoir rotatoire.*

β) *La production d'iodoforme.*

γ) *Le pouvoir réducteur.*

α) *Pouvoir rotatoire.* — Ainsi que PÉRÉ l'avait déjà constaté, la déviation observée au polarimètre est proportionnelle à la concentration de la solution en produit actif. C'est là un grand avantage au point de vue analytique. Mais les déviations constatées sont faibles et, très souvent, les variations qu'il faudra suivre ne porteront que sur les minutes. Dans ces conditions la méthode polarimétrique devient peu précise.

Mais de plus, rien ne prouve qu'à côté de l'acétylméthylcarbinol gauche il n'y ait pas de l'acétylméthylcarbinol droit. Dans ces conditions le pouvoir rotatoire ne serait pas proportionnel à la quantité de cétone alcoolique contenue dans le distillat, mais proportionnel à la différence de concentration des deux isomères lévogyre et dextrogyre.

β) *Production d'iodoforme.* — L'acétylméthylcarbinol, à froid, est décomposé par l'iode en milieu alcalin avec une abondante production d'iodoforme que l'on peut reconnaître à son odeur et à la structure de ses cristaux. Cette réaction est rapide et peut être quantitative si l'on a soin d'opérer toujours dans des conditions rigoureusement identiques.

J'ai employé la technique suivante :

Dans un flacon de 250 cc. avec fermeture à l'émeri, je mets une quantité exactement mesurée de liquide à analyser et je complète à 20 cc. avec de l'eau distillée.

J'ajoute 10 cc. d'une solution d'iode décimale dans de l'iodure de potassium à 10 0/0, et 15 cc. de soude normale. Le flacon, bouché, agité est mis à 30° pendant une demi-heure.

J'ajoute alors 16 cc. d'acide chlorhydrique normal et je titre l'iode non transformé en iodoforme avec de l'hyposulfite décinormal. J'observe le virage avec un peu d'empois d'amidon

très léger. Par différence entre l'iode primitif et l'iode restant, je calcule l'iodoforme formé.

Cette méthode donne des résultats constants si elle est utilisée toujours dans des conditions identiques. Mais elle ne présente aucun avantage sur la méthode de dosage basée sur le pouvoir réducteur et de plus est d'un emploi plus délicat. Aussi n'y ai-je pas eu en général recours.

γ) *Pouvoir réducteur.* — Le distillat des cultures de ces microbes en milieux sucrés est fortement réducteur : il réduit le nitrate d'argent, le bleu de méthylène, etc. Mais la réaction la plus pratique au point de vue analytique est évidemment la réduction de la liqueur de FEHLING. C'est elle que j'ai utilisé pour le dosage de l'acétylméthylcarbinol.

Cependant il faut remarquer qu'il y a dans ce distillat d'autres corps réducteurs : on y a en effet signalé la présence de l'aldéhyde formique et celle du méthylglyoxal.

Le formol n'existe pas toujours et quand il existe ce n'est qu'à l'état de traces qui ne peuvent avoir d'influence sensible sur le pouvoir réducteur.

La présence du méthylglyoxal n'est pas constante et la valeur que j'ai trouvée en général pour le point de fusion de la phénylosazone brute obtenue avec le distillat (235-240-242) montre que si cet aldéhyde cétonique existe ce n'est qu'en très faible quantité. Son osazone fond en effet à 145°.

Donc le pouvoir réducteur du distillat de ces cultures dépend presque exclusivement de sa richesse en acétylméthylcarbinol et peut par suite servir au dosage de ce corps.

Pour mesurer le pouvoir réducteur d'un liquide on peut employer deux méthodes. Dans la première on mesure le volume de la solution nécessaire pour décolorer complètement une quantité donnée de liqueur de FEHLING. C'est la technique employée par WALPOLE (26) qui mesure la quantité de liquide nécessaire pour réduire en totalité et en 10 minutes 1 cc. de liqueur de FEHLING. Cette méthode, rapide, très exacte dans le cas du glucose, du sucre interverti et autres sucres, n'offre ici aucune précision. En effet la liqueur de FEHLING prend une teinte ver-

dâtre puis jaune verdâtre qui empêche d'apprécier avec netteté le moment exact où la décoloration est complète.

Dans la seconde méthode on emploie un excès de liqueur de FEHLING et l'on dose par un procédé quelconque la quantité d'oxydure de cuivre précipité.

J'ai utilisé la méthode indiquée par M. G. BERTRAND pour le dosage des sucres (27). J'ajoute à 20 cc. du distillat plus ou moins dilué, 40 cc. de liqueur de FEHLING et maintiens l'ébullition pendant 3 minutes en ayant soin d'adapter au flacon un réfrigérant ascendant qui condense l'acétylméthylcarbinol. Je filtre dans le vide, sur un filtre en amiante, redissous l'oxydure par du sulfate ferrique et dose le sulfate ferreux formé par le permanganate de potassium.

J'ai ainsi le pouvoir réducteur du distillat exprimé en centimètres cubes de permanganate ou en milligrammes de cuivre. Cette méthode est précise et donne des résultats rigoureusement constants.

J'ai d'autre part vérifié que dans les limites dans lesquelles on opère (170 milligrammes de cuivre au plus par 20 cc. de distillat), le pouvoir réducteur de ce distillat est proportionnel à sa concentration.

Pour déduire du pouvoir réducteur d'une solution sa richesse en acétylméthylcarbinol j'ai utilisé les données établies par M. KLING (28) d'après cet auteur un gramme de cet alcool cétonique réduit à l'état d'oxydure 2 gr. 85 de cuivre. J'ai donc multiplié la quantité de cuivre réduit par le coefficient $\frac{1}{2,85} = 0,35$ pour avoir le nombre de milligrammes d'acétylméthylcarbinol qui étaient contenus dans les 20 cc. analysés.

2° EXTRACTION DE L'ACÉTYLMÉTHYLCARBINOL.—On ne peut songer à doser cet alcool cétonique directement dans la culture microbienne où il y a des sucres réducteurs et d'autres matières organiques capables d'agir sur la liqueur de FEHLING. Il faut donc en faire l'extraction et pour cela distiller la culture.

Mais il faut que cette distillation donne la totalité de ce corps et d'autre part ne le détruise pas partiellement.

L'acétylméthylcarbinol bout à 141-142°, mais est entraînable par la vapeur d'eau. J'ai étudié successivement :

- α) Sa distillation à la pression ordinaire ;
- β) Sa distillation dans le vide.

α) DISTILLATION A LA PRESSION ATMOSPHERIQUE. — En fait ce que j'ai étudié ce n'est pas la courbe de l'acétylméthylcarbinol pur mais celle des produits réducteurs du distillat des cultures du *B. subtilis* en milieux sucrés parmi lesquels, ainsi que je l'ai démontré l'acétylméthylcarbinol est de beaucoup dominant.

Je prends 300 cc. de distillat et j'en distille 250 cc. par portions de 50 cc.

Si l'on évalue le pouvoir réducteur de chaque fraction de 50 cc. par rapport au pouvoir réducteur total des 250 cc. distillés, on obtient des chiffres qui ne concordent pas exactement mais donc les divergences sont néanmoins peu importantes.

	I	II	III
50 cc.	24,25	24,70	24,3
100 —	46,7	46,8	47,1
150 —	65,6	67,0	67,5
200 —	85,0	85,2	85,6
250 —	100,0	100,0	100,0

Mais si l'on exprime le pouvoir réducteur des diverses portions en fonction du pouvoir réducteur total des 300 cc. on obtient des résultats beaucoup moins concordants.

Une proportion assez forte des produits réducteurs reste dans les 50 cc. non distillés mais cette proportion n'est pas constante et oscille de 10 à 20 o/o.

Ces résultats indiquent :

1° Que la distillation à la pression ordinaire ne permet pas d'extraire la totalité de l'acétylméthylcarbinol de la culture.

2° Que cette distillation provoque une altération partielle de ce composé.

Je n'ai pas précisé ce dernier point mais il faut conclure de ce fait, qu'autant que possible tout chauffage prolongé de ce corps devra être évité au cours des manipulations nécessaires pour son extraction

3) DISTILLATION A PRESSION RÉDUITE. — Si l'on distille une culture de *B. subtilis*, en milieu sucré, dans le vide, au bain-marie à 45-50°, les premières portions du distillat sont moins concentrées en acétylméthylcarbinol que les dernières, contrairement à ce qui se produit dans la distillation à la pression atmosphérique.

Voici un exemple :

Culture de *B. subtilis* en milieu minéral sucré.

	Volume en cc.	Pouvoir rotatoire Tube de 4 dcm.
1 ^{re} Portion du distillat .	606	2°29'
2 ^e —	370	2°43'

Pour donner une idée plus précise de ce fait j'ai fait la distillation fractionnée de 300 cc. d'une solution d'acétylméthylcarbinol, par portions de 50 cc. et sous pression réduite.

La première était de 62 millimètres de mercure. Elle était maintenue constante pendant toute la durée de la distillation.

J'ai ensuite dosé l'acétylméthylcarbinol par le pouvoir réducteur des diverses fractions avec la liqueur de FEHLING comme je l'ai indiqué précédemment.

	acétylméthylcarbinol pour 100 de ce produit distillé	acétylméthylcarbinol pour 100 du produit total
1 ^{re} portion 50 cc.	17,10	12,89
2 ^e — 100 —	35,33	26,95
3 ^e — 150 —	55,08	42,54
4 ^e — 200 —	76,60	59,14
5 ^e — 250 —	100,00	77,52

Donc dans le vide, l'acétylméthylcarbinol se concentre dans le liquide résiduel contrairement à ce qui se passe pendant la distillation à la pression atmosphérique.

Ces chiffres indiquent également que l'entraînement de ce produit se fera d'autant mieux que ce dernier sera plus concentré dans la solution.

Mais ils n'indiquent pas si l'extraction peut être complète.

50 cc. d'une culture de *subtilis* en milieu sucré sont distillés dans le vide à 45-50° jusqu'à siccité.

Le distillat contient 35 milligrammes d'acétylméthylcarbinol.

J'ajoute un peu d'eau, 10 cc., et je distille à sec. Je mets une seconde fois 10 cc. d'eau et je distille à nouveau. Ces 20 cc. d'eau ont encore entraîné de l'acétylméthylcarbinol ; ils en contiennent en effet 7 milligrammes.

La première distillation n'a donc pas donné la totalité de ce produit.

J'ajoute une quatrième fois 10 cc. d'eau et je distille dans le vide. Je n'obtiens que des traces d'acétylméthylcarbinol.

Le distillat ne réduit en effet que 1 milligramme 5 de cuivre. J'ai résumé dans le tableau suivant la marche de cette extraction.

	Cuivre réduit	acétylméthylcarbinol 0/0
1 ^{re} Distillation.	1 gr. 003	97,91
2 ^e et 3 ^e distillations. . . .	0 — 0199	1,99
4 ^e Distillation.	0 — 0015	0,15

Une nouvelle distillation n'a plus donné de produit réducteur.

Donc on peut par distillation dans le vide extraire la totalité de l'acétylméthylcarbinol contenue dans la culture mais il faut, pour que l'entraînement soit assez rapide, laver de nombreuses fois le résidu et chaque fois avec peu d'eau.

Méthode analytique. — Ces notions me permettent d'établir une méthode analytique.

Je distille dans le vide, sans dépasser une température de 45°, une quantité exactement mesurée de culture : 50 cc. par exemple. Le résidu est repris par un peu d'eau et si l'extrait en est abondant, j'ajoute quelques boules de verre et j'agite fortement de manière à dissoudre tous les produits solubles du résidu. Je distille dans le vide. Je répète cette opération quatre à cinq fois puis je vérifie qu'une nouvelle distillation ne donne plus de produits réducteurs. S'il n'en était pas ainsi je ferais encore quelques lavages. Les distillats sont réunis et amenés à un volume exactement déterminé. Je dose l'acétylméthylcarbinol sur une portion aliquote suivant la méthode que j'ai indiquée précédemment.

Cette technique donne des résultats absolument concordants. Elle est assez longue mais présente sur les autres un grand avantage : c'est que l'extraction est faite à l'abri de l'oxygène et à une température qui ne dépasse pas 45-50°. Dans ces conditions on a la totalité de l'acétylméthylcarbinol sans risquer de provoquer son altération.

III

La possession d'une méthode analytique suffisamment précise permet maintenant de rechercher si la présence de l'acétylméthylcarbinol explique les valeurs que j'ai trouvées pour le quotient respiratoire.

Si l'on admet que cet alcool cétonique provient directement de l'oxydation du glucose, on doit obtenir un rapport $\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$ égal à 2.



Donc $\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$ est égal au rapport $\frac{4 \text{ vol.}}{2 \text{ vol.}}$ soit à 2.

Je ne pouvais pas doser l'acétylméthylcarbinol dans les cultures qui m'ont servi à faire l'analyse des gaz. J'ai doncensemencé, en même temps, avec la même culture de *Bacillus subtilis*, des bouillons identiques, contenus dans des ballons

de même forme et de même contenance. Ces cultures furent mises ensemble à l'étuve. Les unes me servirent à l'étude des échanges gazeux, les autres me permirent de doser l'acétylméthylcarbinol formé. Les résultats obtenus peuvent donc être rapprochés.

J'indique ci-dessous les chiffres qui se rapportent à 50 cc. de culture.

Durée jours	Acétylméthylcarbinol mgr.	Oxygène absorbé cc.	Acide carbonique dégagé cc.	$\frac{CO_2}{O_2}$
2	99	147,86	259,46	1,75
6	508	478,65	736,37	1,53
12	362	567,05	820,42	1,45

Calculons d'après la formule A les quantités d'oxygène absorbé et d'acide carbonique dégagé pour produire respectivement 99 ; 508 et 362 milligrammes d'acétylméthylcarbinol. Le tableau suivant donne les résultats.

jours	Acétylméthylcarbinol mgr.	Oxygène absorbé cc.	Acide carbonique dégagé cc.
2	99	25	50
6	508	129	257
12	362	92	183

Ces chiffres montrent que la formation de l'acétylméthylcarbinol n'explique pas à elle seule les échanges gazeux observés. Si l'on retranche de ceux du tableau précédent on obtient les quantités d'oxygène absorbé et les quantités d'acide carbonique dégagé sous l'influence d'une autre réaction.

jours	Oxygène absorbé cc.	Acide carbonique dégagé cc.	Rapport $\frac{CO_2}{O_2}$
2	123	210	1,70
6	350	479	1,37
12	475	637	1,34

Les valeurs du quotient respiratoire sont encore supérieures à l'unité. Donc cette autre réaction n'est pas purement et

simplement la combustion du glucose qui exige un rapport $\frac{CO_2}{O_2}$ égal à 1.

Par conséquent à côté de la fermentation qui produit l'acétylméthylcarbinol, il y en a nécessairement une autre qui donne naissance à un autre corps également plus réduit que le glucose. Un pareil composé n'a jamais été signalé.

D'ailleurs l'expérience que j'ai faite en privant rapidement d'oxygène une culture de *B. subtilis* me permettait de prévoir ce résultat et de dire en outre que le composé qui doit exister, doit être plus réduit même que l'acétylméthylcarbinol. En effet dans cet essai le quotient respiratoire était égal à 2,21, ce que ne peut expliquer la formule A.

CHAPITRE IV

Butylèneglycol

Dans le chapitre précédent j'ai montré que les composés signalés parmi les produits de l'assimilation du glucose par le *B. subtilis*, ne peuvent expliquer à eux seuls les échanges gazeux provoqués par ce microbe cultivé en milieu sucré.

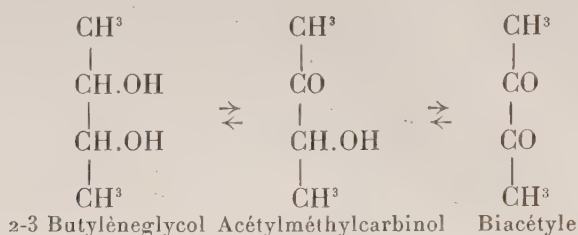
Donc la fermentation du glucose par le *B. subtilis* donne un composé dont la présence n'a pas encore été signalé. C'est la recherche de ce composé qui fera l'objet de ce chapitre.

*
* *

Ce produit doit être plus réduit que le glucose. J'ai démontré également qu'il devait même être plus réduit que l'acétylméthylcarbinol. D'autre part il est naturel de penser qu'il peut-être en relation chimique avec les divers composés que l'on a trouvé dans les cultures du *B. subtilis*. Notamment, la formation directe de l'acétylméthylcarbinol aux dépens du glucose, bien que possible semble peu vraisemblable et l'on est amené à rechercher s'il n'existe pas un corps intermédiaire. Or le 2-3 butylèneglycol peut fort bien être cet intermédiaire et par sa composition centésimale, ce corps, s'il existait permettrait d'expliquer la nature des échanges gazeux.

Au point de vue chimique le 2-3 butylèneglycol et l'acétylméthylcarbinol sont très voisins et forment, avec le biacétyle,

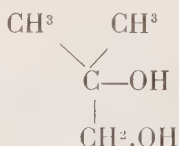
trois termes qui peuvent dériver facilement les uns des autres par oxydation ou réduction.



Pour les phénomènes de réduction je signalerai le travail de SABATIER et MAILHE (29). L'oxydation est facile et assez régulière sous l'influence de l'eau de brome et peut se faire par voie biochimique ainsi que l'a établie KLING (28) avec la bactérie du sorbose.

D'autre part le butylèneglycol a déjà été signalé dans diverses fermentations.

En 1882 HENNINGER isole un glycol butylénique des produits d'une fermentation alcoolique (31). Malheureusement les cultures n'étaient pas pures et si la fermentation de ce composé sous l'influence de la levure est vraisemblable, elle n'est pas certaine. D'ailleurs le glycol est le glycol isobutylénique.



Des résultats analogues furent obtenus par CLAUDEN et MORIN (32), MORIN (33), et HENNINGER et SANSON (34). En 1906 HARDEN et WALPOLE (35) montrent que la fermentation anaérobie du sucre par le *B. lactis aerogenes* provoque la formation de traces d'acétylméthylcarbinol et la production abondante du 2.3 butylène-glycol.

THOMPSON observe les mêmes faits avec le *B. cloacae* (36) Mais dans toutes ces fermentations, soit par la levure, soit par le *B. lactis aerogenes*, soit par le *B. cloacae*, le glycol butylénique se forme et s'accumule en l'absence d'oxygène. Jamais on

n'a signalé la présence de ce produit si réduit parmi les composés formés par la combustion du glucose par des microbes aérobies stricts. En particulier HARDEN et NORRIS ont étudié l'action du *B. subtilis* et d'autres microbes voisins sur le glucose : ils ont trouvé de l'acétylméthylcarbinol mais n'ont pas signalé le 2.3. butylèneglycol (37).

A priori, la formation et surtout l'accumulation d'un tel composé, dans des conditions d'oxydation intense, semblent peu vraisemblables. Mais précisément, les observations que j'ai faites au cours de l'étude des échanges respiratoires me montrent la présence nécessaire dans les produits de fermentation d'un composé très réduit. C'est pourquoi j'ai recherché si le *B. subtilis* ne donnait pas, en milieu sucré, du 2.3 butylène glycol.

*
* *

Pour la recherche de l'isobutylèneglycol dans les produits de la fermentation alcoolique, HENNINGER distille et rectifie dans le vide avec un deflegmateur puissant. Le résidu est rectifié à la pression ordinaire et on obtient le glycol par distillation fractionnée.

HARDEN a utilisé en somme la même technique mais pour éliminer les peptones et une partie des sucres, il reprend le résidu de la distillation dans le vide par de l'alcool et c'est cette solution alcoolique qu'il soumet à la rectification.

Ces méthodes sont longues, exigent une quantité importante de culture et ne permettent pas de mettre en évidence de petites quantités de glycol.

Le 2.3 butylèneglycol bout à 183-184° et dans le vide est entraînable par la vapeur d'eau, mais cet entraînement est lent et difficile. C'est cette propriété qui m'a servi à rechercher ce glycol. Dans toutes les manipulations que je fais pour son extraction j'ai soin d'opérer dans le vide, sans dépasser une température de 45-50°. Les causes d'altération sont donc réduites au minimum.

Je distille une culture de *B. subtilis* en milieu sucré dans le vide à 50°. Je lave le résidu comme je l'ai indiqué, pour extraire la totalité de l'acétylméthylcarbinol. Quand ce résultat est atteint, je continue les lavages et les distillations successives, avec chaque fois 5 à 10 cc. d'eau.

Le liquide qui distille, en se condensant dans le réfrigérant présentent des gouttelettes huileuses comparables à celles provoquées par l'alcool.

Le distillat est un liquide incolore, dont l'odeur est surtout celle de la peptone. Ce liquide, additionné d'acide sulfurique, réduit fortement le bichromate de potassium en dégageant une odeur d'aldéhyde. Il y a donc entraînement par la vapeur d'eau d'une matière organique. Cet entraînement a lieu, que la culture soit acide, neutre ou alcaline. Cette matière organique est donc un corps neutre.

Le distillat ne recoloré pas la fuchsine décolorée par le bisulfite de soude, il ne donne pas la réaction de LEGAL, il ne réduit pas la liqueur de FEHLING. Traité par la phénylhydrazine en milieu acétique, il ne donne ni hydrazone ni osazone. Donc le produit neutre qu'il contient n'a ni fonction aldéhydique ni fonction cétonique.

Cependant il réagit un peu avec l'iode en milieu alcalin. Si à ce distillat on ajoute de l'iode et un peu de lessive de soude il ne se forme pas d'iodoforme. Mais si l'action est très prolongée, et surtout si l'alcalinité est assez forte, on perçoit à la longue une légère odeur d'iodoforme et même on observe la formation de ses cristaux caractéristiques.

Donc cette substance ne semble pas donner directement la réaction de l'iodoforme, mais paraît se transformer peu à peu en produit capable de la provoquer.

Je traite ce distillat par un peu d'eau de brome, au bain-marie à 100°, dans un récipient muni d'un réfrigérant ascendant. Après 10 à 15 minutes, je sature l'excès de brome par la quantité juste nécessaire de bisulfite de soude. Le liquide ainsi obtenu présente des propriétés toutes nouvelles.

Il est fortement réducteur : réduit la liqueur de FEHLING, le

bleu de méthylène, le nitrate d'argent. Il ne recolore pas la fuchsine décolorée par le bisulfite de soude, mais en présence d'iode et de soude donne, à froid, et rapidement un abondant précipité d'iodoforme.

Traité par la phénylhydrazine en milieu acétique, il donne une osazone jaune clair.

Donc, sous l'action oxydante du brome, le produit neutre du distillat s'est transformé en un composé aldéhydique ou acétonique. Il doit donc appartenir à la classe des alcools.

L'osazone que l'on obtient est peu soluble dans les divers solvants, alcool, éther, etc. Elle est, en solution, facilement oxydable. Après purification par l'alcool, puis dessiccation dans le vide sur l'acide sulfurique, elle fond exactement à 243°. C'est donc l'osazone du biacétyle $\text{CH}_3\text{CO.CO.CH}_3$. D'ailleurs, traitée par l'acide chlorhydrique dilué, elle donne un produit qui, isolé par rectification, se présente sous la forme d'un liquide vert comme le biacétyle.

Le distillat oxydé contenait donc soit de l'acétylméthylcarbinol, soit du biacétyle. Il réduit la liqueur de FEHLING à froid. Donc il contient de l'acétylméthylcarbinol. D'autre part, si on a mis suffisamment de brome, si son action a été suffisamment prolongée, la rectification donne un liquide qui passe avant la vapeur d'eau et qui a la couleur verte caractéristique du biacétyle.

Donc, les produits d'oxydation du distillat sont l'acétylméthylcarbinol et le biacétyle. Par conséquent le produit primitif était le 2.3 butylèneglycol.

La formation de ce glycol en milieu sucré, sous l'influence du *B. subtilis*, en conditions aérobies est ainsi démontrée.

*
* *

Il conviendrait maintenant de rechercher comme je l'ai fait pour l'acétylméthylcarbinol une méthode permettant de doser le butylèneglycol. Malheureusement ce problème est plus difficile : nous l'avons abordé, M. Ruor et moi, mais les

résultats ne sont pas encore assez précis pour que je puisse m'en servir.

Je me contenterai donc de donner quelques chiffres qui n'auront aucune valeur absolue, mais qui permettront de donner une idée de la marche de l'extraction par la méthode que j'ai proposée, de montrer que cette extraction est lente, mais peut être totale et enfin de voir s'il y a peu ou beaucoup de butylèneglycol formé.

Pour apprécier approximativement la quantité de glycol contenu dans une solution, je traite 20 cc. de celle-ci par 5 cc. d'eau saturée de brome, pendant 5 minutes, à 100°. Après refroidissement, je sature l'excès de brome par la quantité juste suffisante de bisulfite de soude, j'amène à un volume de 50 cc. et je dose avec la liqueur de FEHLING les produits réducteurs formés. J'emploie pour cela la même technique que dans le cas de l'acétylméthylcarbinol.

Ainsi que nous l'avons observé, M. RUOT et moi, les résultats ainsi obtenus n'ont pas de valeur absolue, mais sont assez comparables si l'on opère toujours exactement dans les mêmes conditions.

Pour l'extraction, il y a intérêt à laver souvent, mais chaque fois avec un peu d'eau : 5 ou 10 cc. L'entraînement se fait d'autant mieux que la concentration est plus forte. 100 cc. d'eau mis en une seule fois n'entraînent pas plus de butylèneglycol que 10 cc. et le distillat obtenu est beaucoup plus dilué.

Quand l'extrait sec est abondant, il y a intérêt de temps en temps à le mettre complètement en dissolution dans l'eau en agitant fortement le ballon après y avoir ajouté des perles de verre.

L'extraction peut se faire aussi par la vapeur, mais le procédé que j'ai employé a l'avantage de ne pas exiger une température supérieure à 50°. Le distillat que l'on obtient est ainsi très pur. Pour y concentrer le butylèneglycol, il suffit de le soumettre à la rectification à la pression ordinaire.

Je vais maintenant donner deux exemples d'extraction.

1^{er} Exemple. — Culture de *B. subtilis* en milieu minéral peptoné additionné de 3 o/o de saccharose. Température : 30°. Age : 3 jours.

La distillation est faite dans le vide à 45° en milieu neutre. Les résultats sont exprimés en milligrammes de cuivre réduit.

	Volume cc.	Pouvoir réducteur		
		Avant oxydation au brome	Après oxydation au brome	Différence
1 ^{er} distillat	505	808	»	»
2 ^e —	140*	52	448	396
3 ^e —	345	0	862	862
4 ^e —	375	0	262	262
5 ^e —	380	0	171	171
6 ^e —	111	0	17	17
7 ^e —	210	0	10	10
8 ^e —	75	0	traces	traces
9 ^e —	109	0	0	0

860 milligrammes de cuivre ont été réduit à l'état d'oxydure par l'acétylméthylcarbinol.

1.718 milligrammes de cuivre ont été réduit par l'acétylméthylcarbinol et le biacéthyle provenant de l'oxydation du 2. 3. butylèneglycol.

2^o Expérience. — Les conditions sont identiques à ceux de l'expérience 1^{re} mais la culture est âgée de sept jours.

La distillation est faite dans le vide en milieu neutre. Le bain-marie est à 45°.

Les résultats sont exprimés en milligrammes de cuivre réduit.

	Volume cc.	Pouvoir réducteur		
		Avant oxydation par le brome	Après oxydation par le brome	Différence
1 ^{er} distillat	520	5.564	»	»
2 ^e —	105	155	331	176
3 ^e —	78	31	187	156
4 ^e —	110	22	264	242
5 ^e —	395	0	1.461	1.461
6 ^e —	550	0	935	935
7 ^e —	290	0	252	232
8 ^e —	210	0	105	105
9 ^e —	220	0	44	44
10 ^e —	410	0	20	20
11 ^e —	320	0	traces	traces
12 ^e —	210	0	0	0

5.772 milligrammes de cuivre ont été réduits à l'état d'oxydure par l'acétylméthylcarbinol.

3.371 milligrammes de cuivre ont été réduits par l'acétylméthylcarbinol et le biacéthyle qui proviennent de l'oxydation du 2. 3 butylèneglycol.

En fait, ainsi que je l'ai observé à plusieurs reprises dans ces conditions d'oxydation ménagée, il ne se forme que très peu de biacétyle et le pouvoir réducteur est presque exclusivement dû à la présence de l'acétylméthylcarbinol. Mais malheureusement il ne permet pas de calculer exactement la proportion de glycol primitive, car l'oxydation n'est pas intégrale. Si celle-ci était complète, ces chiffres seraient plus élevés.

Néanmoins ils permettent :

1° De conclure que l'entraînement du 2.3 butylèneglycol par la vapeur d'eau dans le vide peut être complète.

2° De se rendre compte si la présence du 2.3 butylèneglycol peut expliquer la nature des échanges gazeux observés.

Prenons en effet la première expérience faite après 3 jours.

1.718 milligrammes de cuivre ont été réduits par l'acétylméthylcarbinol provenant du 2.3 butylèneglycol alors que 860 milligrammes étaient réduits par l'acétylméthylcarbinol primitif. Donc dans une culture de cet âge il y a plus de deux fois plus de 2.3 butylèneglycol que d'acétylméthylcarbinol.

Or appliquons ce résultat à l'expérience que j'ai faite en atmosphère confinée avec une culture de deux jours.

Les échanges gazeux ont été :

Oxygène absorbé	Acide carbonique dégagé	Rapport $\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$
—	—	—
cc.	cc.	
148	259	1,75

Il y a eu formation de 99 milligrammes d'acétylméthylcarbinol donc de plus de 198 milligrammes de 2.3 butylèneglycol.

Or la formation de ce produit aux dépens du glucose peut être représentée par la formule suivante :



Le quotient respiratoire est de 4.

Les échanges gazeux provoquées par la formation de ces deux composés sont donc de :

	Oxygène absorbé	Acide carbonique dégagé
Par la production de l'acétylméthylcarbinol .	25	50
Par la production du 2.3 butylèneglycol. . .	24	97
Totaux . . .	49	147

Retranchons ces chiffres des quantités de gaz totales. Il reste que 99 cc. d'oxygène ont été absorbés et 112 cc. d'acide carbonique ont été dégagés par suite d'une autre réaction. Le rapport $\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$ est égal à 1,13. Or ce chiffre de 1,13 est trop fort, car la quantité de 198 milligrammes de butylèneglycol est trop faible.

Donc, indépendamment de la formation de l'acétylméthylcarbinol et de celle du 2.3 butylèneglycol, il y a une autre réaction oxydante, mais qui donne un quotient respiratoire $\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$ voisin de 1 comme le fait la combustion complète du sucre. Il n'y a donc pas lieu, pour expliquer les résultats donnés par l'analyse des gaz, de rechercher la présence d'un autre corps plus réduit que le glucose et la production du butylèneglycol et celle de l'acétylméthylcarbinol permettent d'expliquer la nature des échanges gazeux observés.

CHAPITRE V

Origine et rôle physiologique de l'acide valérianique de l'acétylméthylcarbinol et du butylèneglycol

L'acide valérianique, l'acétylméthylcarbinol, et le 2.3 butylèneglycol peuvent expliquer les valeurs que j'ai obtenues pour le rapport $\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$ au cours de la combustion du sucre par le *B. subtilis*. Il reste à expliquer maintenant quelle est l'origine exacte de ces matières organiques et quel est leur rôle physiologique.

*
* *

La production de l'acide isovalérianique a déjà été signalée par DUCLAUX dans les produits de la fermentation du lait par le *Tyrothrix tenuis* et le *T. scaber* et autres (10), et par DEHERAIN et DUPONT au cours de l'assimilation de la légumine par le *B. mesentericus ruber* (12). Or dans ces deux milieux l'oxydation porte presque exclusivement sur la matière azotée : le bouillon de légumine renferme en effet peu d'hydrates de carbone et le lactose du lait n'est pas hydrolysable par ces bactéries.

J'ai fait de nombreuses cultures du *B. subtilis* et de *B. mesentericus ruber* en milieux minéraux dans lesquels la peptone de CHAPOTEAUT était le seul élément organique. J'ai trouvé de l'acide valérianique. L'addition de substances ternaires ou

bien n'influe pas sur sa production ou la diminue considérablement.

Voici par exemple les quantités d'acide valérianique qui ont été formées dans 500 cc. de bouillon minéral peptonéensemencé avec le *B. subtilis*.

Jours	Sans addition d'alcool	Avec 2 o/o d'alcool
5	0 gr. 105	0 gr. 098
15	0 gr. 094	0 gr. 111

Le même milieu additionné de 4 o/o de saccharose ne donne plus pour 500 cc. que 16 milligrammes d'acide valérianique.

Donc cet acide gras provient de la matière organique azotée. Il dérive très probablement de la désamination des acides aminés et notamment de la leucine par oxydation de l'alcool amylique.

L'origine de l'acétylméthylcarbinol n'est pas évidente *a priori* et on peut se demander si cet alcool cétonique ne dérive pas de la matière azotée. Sa constitution chimique ne permet pas en effet de la rattacher directement aux hydrates de carbone.

J'ai fait des cultures de *B. subtilis*, de *B. mesentericus ruber* et autres microbes voisins en milieux riches en matières organiques azotées et dépourvues d'autres composés carbonés. Jamais je n'ai pu, en des telles cultures, mettre en évidence la présence d'acétylméthylcarbinol. Pour cette recherche je distille les liquides fermentés et je traite tout le distillat par la liqueur de FEHLING. Je filtre sur filtre à amiante. Dans ces conditions mêmes des traces extrêmement faibles d'oxydure deviennent visibles. Cette technique cependant très sensible ne m'a jamais permis de trouver un corps réducteur volatil dans les produits de fermentation des matières organiques azotées par ces microbes.

J'ai fait des cultures dans les mêmes conditions mais après additions de produits ternaires qui, ainsi que l'expérience me l'avait prouvé, ne pouvaient donner à eux seuls de l'acé-

tylméthylcarbinol, mais qui étaient capables de protéger ce produit de l'oxydation. Des essais faits ainsi avec de l'alcool éthylique, de l'acide lactique sous forme de lactates, me donnèrent des résultats négatifs. Donc, si les matières azotées organiques sont capables de donner de petites quantités d'acétylméthylcarbinol, il est impossible de le mettre en évidence.

D'autre part si dans un milieu peptoné j'ajoute un peu de sucre, l'acétylméthylcarbinol apparaît immédiatement. Sa formation peut être mise en évidence de manière plus nette si on le protège de l'oxydation en ajoutant de l'alcool éthylique par exemple.

Expériences. — Bouillon de haricots additionné de 10/00 de peptone et de 0,25 0/0 de nitrate de sodium. Le bouillon de haricots contient des hydrates de carbone en petites quantités.

Les résultats sont exprimés en acétylméthylcarbinol pour 100 cc.

	Durée	Sans addition de saccharose		avec addition de 10/0 de saccharose	
		sans alcool	avec 20/0 d'alcool	sans alcool	avec 20/0 d'alcool
{	3 jours	0	1,2	1	3,5
{	6 —	0	0	0	0
{	1 —	1	1,4	1,7	6,7
{	2 —	0	0	traces	1,3
{	3 —	0	0	0	0

Si on additionne les mêmes milieux de 0,5, 1, 2, etc. 0/0 de sucre, la proportion d'acétylméthylcarbinol formé augmente avec la teneur en sucre.

Enfin des cultures de ces microbes en milieux minéraux où le saccharose est la seule matière organique, contiennent beaucoup d'acétylméthylcarbinol.

Donc, dans les milieux sucrés, cet alcool cétonique a bien le sucre comme origine.

Pour le butylèneglycol je peux répéter exactement ce que je viens de dire pour l'acétylméthylcarbinol.

La formation de ce glycol dans les bouillons organiques où la matière azotée est la seule substance carbonée ne peut pas être mise en évidence et par contre elle est abondante dans les

milieux minéraux où le sucre est le seul produit organique.

Donc tandis que l'acide valérianique dérive des matières organiques azotées, le butylèneglycol et l'acétylméthylcarbinol qui se forment dans les milieux sucrés proviennent du sucre.

*
* *

Ces deux composés sont donc des produits de fermentation du sucre : ils doivent en être des produits de digestion et capables d'être assimilés par les organismes qui les ont formés.

PÉRÉ, qui ignorait la nature de l'acétylméthylcarbinol a cependant fort bien compris la signification biologique de ce produit. Il constate en effet que le produit lévogyre et réducteur qu'il trouve dans le distillat, augmente peu à peu avec l'âge de la culture, atteint un maximum, décroît et disparaît totalement. Il prouve donc ainsi son utilisation par les organismes qui le produisent. Il montre même que si l'on entraîne suffisamment le microbe, la combustion peut devenir totale et que cette substance transitoire n'apparaît plus. Il prouve ce fait intéressant par une série d'expériences et en remplaçant les termes d'aldéhyde glycérique et de glycérose par celui d'acétylméthylcarbinol, on peut considérer comme exact et très nettement observé tout ce qu'a dit PÉRÉ dans cette partie de son travail.

J'ai constaté l'utilisation de l'acétylméthylcarbinol par le *Bacillus subtilis* par une autre méthode.

A du bouillon de haricots peptoné à 10/00, j'ajoute du distillat d'une culture de *B. subtilis* en milieu sucré. Je stérilise à l'autoclave et j'ensemence avec du *B. subtilis*. Ce microbe aura donc de l'acétylméthylcarbinol pour aliment. Les résultats suivants montrent comment il l'utilise.

Les résultats sont exprimés en milligrammes d'acétylméthylcarbinol pour 100 cc. de culture.

	Acétylméthylcarbinol restant	Acétylméthylcarbinol consommé
Milieu primitif. .	47,00	»
Après 2 jours . .	30,50	16,50
Après 5 jours . .	8,00	39,00
Après 6 jours . .	0,00	47,00

Le manque d'une méthode analytique précise m'a empêché de suivre avec détails les variations que subit le 2-3 butylèneglycol au cours d'une fermentation mais le procédé d'appréciation approximatif que j'ai indiqué, me permet de montrer avec certitude la nature de ces variations.

Le butylèneglycol apparaît immédiatement : on le trouve au bout de 24 heures dans des cultures en milieu peptoné.

J'ai cultivé du *B. subtilis* en milieu minéral peptoné additionné de 3 o/o de saccharose. Ce bouillon était réparti par 500 cc. dans des flacons FERNBACH. J'ai fait l'extraction comme je l'ai indiqué précédemment. Les résultats indiquent en milligrammes de cuivre, le pouvoir réducteur de ces cultures, pouvoir réducteur dû à l'acétylméthylcarbinol initial, puis après oxydation au brome, le pouvoir réducteur dû aux produits d'oxydation du 2.3 butylèneglycol. Ainsi que je l'ai signalé, ces derniers chiffres sont trop faibles.

Jours	Pouvoir réducteur	
	dû à l'acétylméthylcarbinol primitif	dû à l'acétylméthylcarbinol provenant du 2-3 butylèneglycol
3	860	1.718
7	5.772	3.371
14	5.007	1.863
23	n'a pas été dosé mais il y a encore de l'acétyl- carbinol	

Ces résultats montrent que comme l'acétylméthylcarbinol, le 2-3 butylèneglycol, produit de fermentation du sucre, est un produit de digestion qui à son tour est utilisé.

Au début des cultures, il y a plus de glycol que d'alcool cétonique, puis le butylèneglycol décroît alors que l'acétylméthylcarbinol augmente encore et enfin tandis que ce dernier est encore présent dans la culture, le glycol butylénique a disparu.

Ces résultats montrent non seulement que ces deux produits sont utilisés, mais indiquent également qu'ils doivent être liés l'un à l'autre et que l'acétylméthylcarbinol doit déri-

ver du 2.3 butylèneglycol, comme leur formule le rend vraisemblable.

D'ailleurs WALPOLE en se servant du *B. lactis aerogenes* a montré, qu'en milieu aérobie, le butylèneglycol se transforme en acétylméthylcarbinol (26).

Dans toutes ces expériences ce furent surtout le *B. subtilis* et deux ou trois microbes voisins qui furent utilisés.

DESMOTS a cependant essayé un certain nombre de microbes du même groupe pour la formation de l'acétylméthylcarbinol (18).

J'ai recherché, si cette fermentation spéciale du glucose pouvait se produire avec la généralité des microbes du groupe du *B. subtilis*. Je réunis les résultats obtenus dans le tableau suivant.

Les cultures sont faites en bouillon de haricots additionné de 4 grammes de saccharose et de 0 gr. 5 de peptone de CHAPOTEAUT pour 100 cc. L'analyse est faite après cinq jours.

J'ai exprimé l'acétylméthylcarbinol en milligrammes pour 100 cc. Quant au 2.3 butylèneglycol je mets une croix + pour indiquer que je l'ai trouvé, un zéro si je ne le rencontre pas. Dans les autres essais je ne l'ai pas recherché.

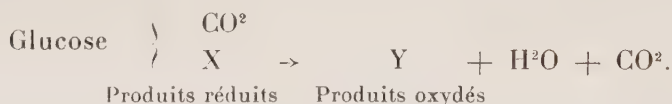
Origine	Microbe	Aspect de la culture	Acétylméthyl- carbinol	Butylène glycol
Lait	B. 16	assez belle culture	20	—
—	B. 2	belle culture	145	+
—	B. 9	belle culture	289	—
—	B. 5	belle culture	223	+
—	B. 4	belle culture	35	—
—	B. IV	très belle culture	329	+
—	B. 8	belle culture	92	+
—	B.-A	très belle culture	298	+
—	12/5	très belle culture	153	+
—	T n° 2	très belle culture	301	+

La production du 2.3 butylèneglycol est donc comme celle de l'acétylméthylcarbinol une propriété générale des bactéries du groupe du *B. subtilis*.

CONCLUSIONS DE LA DEUXIÈME PARTIE

L'étude des échanges respiratoires d'une culture de *B. subtilis* en milieu sucré m'a permis de démontrer que ce microbe pour oxyder la molécule de sucre commence par la disloquer. Il y a fermentation avant qu'il n'y ait combustion et la combustion porte sur les produits de fermentation.

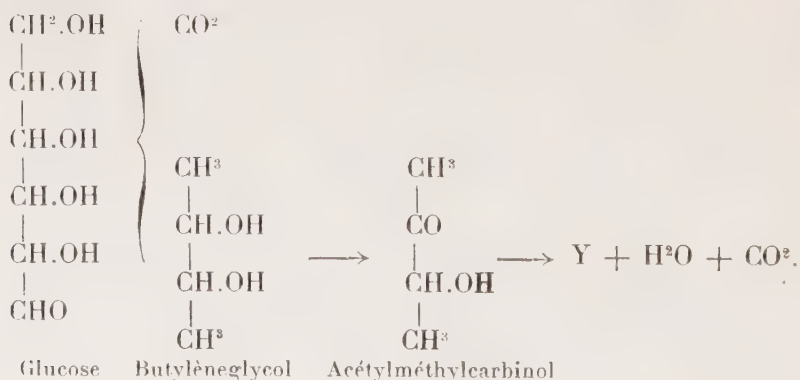
J'ai pu ainsi, sans faire aucune hypothèse représenter le processus de l'assimilation du glucose par le *B. subtilis* par le schéma suivant :



L'étude des produits de la culture me permet maintenant de préciser ce schéma.

Les produits de la fermentation du glucose par le *B. subtilis* sont en effet le 2.3 butylèneglycol et l'acéthylméthylcarbinol. De plus le second de ces produits dérive du premier. Enfin tous deux peuvent être oxydés et disparaître.

Je puis résumer ces faits dans un nouveau schéma :



C'est là un type spécial de fermentation que l'on peut appeler fermentation butylèneglycolique.

Elle est générale, ainsi que je l'ai démontré, aux microbes du groupe du *B. subtilis* avec lesquels elle se produit en milieu aérobie.

D'autre part, elle peut être provoquée par d'autres organismes, dans d'autres conditions : HARDEN et THOMPSON l'ont en effet constaté en milieu anaérobie avec le *B. lactis aerogenes* et le *B. cloacæ*.

Mais il est difficile d'admettre la transformation directe du glucose en 2.E butylèneglycolsans qu'il y ait de produits intermédiaires.

Ce schéma est donc encore trop général et c'est à la recherche d'un produit transitoire de la fermentation butylèneglycolique du glucose que sera consacrée la troisième partie de ce travail.

TROISIÈME PARTIE

PRODUITS INTERMÉDIAIRES DE LA FERMENTATION BUTYLÈNEGLYCOLIQUE

Il est difficile d'admettre que le 2.3 butylèneglycol et l'acétylméthylcarbinol dérivent directement du glucose ou d'un hexose quelconque.

D'autre part, l'expérience prouve qu'ils peuvent provenir d'autres composés plus simples comme la glycérine.

PÉRÉ a constaté que le *T. tenuis* donnait un produit réducteur, lévogyre et volatile dans un milieu glycérimé (17) et DESMOT a prouvé que ce composé était l'acétylméthylcarbinol (18). J'ai vérifié ce fait à plusieurs reprises. J'ai recherché d'autre part si le *B. subtilis* dans un tel bouillon pouvait donner du 2.3. butylèneglycol. Il s'en forme un peu, mais extrêmement peu, c'est-à-dire qu'on ne peut en mettre en évidence que des traces. Le *B. subtilis* pousse plus lentement en milieu glycérimé qu'en milieu sucré, et le butylèneglycol formé doit être oxydé au fur et à mesure de sa production.

HARDEN et NORRIS ont montré que le *Bacillus lactis aerogenes* en milieu anaérobie ne donne pas traces d'acétylméthylcarbinol aux dépens de la glycérine, mais forme par contre du 2.3. butylèneglycol (21). THOMPSON a obtenu des résultats analogues avec le *B. cloacae* (36).

Donc ces corps à quatre atomes de carbone peuvent être constitués aux dépens de composés à trois atomes de carbone seulement. Il y a là une synthèse analogue à celle qui a lieu dans la fermentation butyrique.

Ces faits prouvent l'existence nécessaire de produits intermédiaires dans la fermentation butylèneglycolique du glucose.

Seul de tous les auteurs, HARDEN s'est occupé de cette question et s'inspirant des travaux de BUCHNER sur la fermentation butyrique il a recherché si le *B. lactis aerogenes* ne pouvait pas faire la synthèse du butylèneglycol en partant de l'aldéhyde acétique (30).

Les expériences qu'il a institué à ce sujet lui ont prouvé que cette réaction était possible.

Mais il ne dit rien de précis quant à la formation de cet aldéhyde qui *a priori* ne paraît pas pouvoir dériver directement de la glycérine ou du glucose. Et nous sommes ainsi amené à rechercher des corps intermédiaires de la fermentation butylèneglycolique autres que l'aldéhyde acétique.

Ce ou plutôt ces composés devront avoir au plus trois atomes de carbone puisqu'ils peuvent dériver de la glycérine.

La combustion du glucose par le *B. subtilis* est assez brutale et à part le 2.3 butylèneglycol et l'acétylméthylcarbinol on ne trouve guère que des acides volatils, l'aldéhyde formique et comme l'a signalé M. FERNBACH un peu de dioxyacétone et de méthylglyoxal.

Au contraire, les produits de fermentation du *B. lactis aerogenes* et au *B. cloacae* sont nombreux puisqu'en outre des corps à quatre atomes de carbone on trouve de l'acide lactique, de l'alcool éthylique et des acides volatils.

On est tout naturellement amené à considérer ces composés secondaires de la fermentation butylèneglycolique, dioxyacétone, méthylglyoxal, alcool, acide lactique, comme des produits intermédiaires qui précèdent la formation de 2.3 butylèneglycol.

Or un des processus les plus fréquents de la dégradation de la molécule d'un hydrate de carbone est la fermentation lactique. De très nombreux microbes, les ferments lactiques peuvent décomposer le sucre en deux molécules d'acide lactique.



Mais d'autres organismes qui provoquent d'autres fermentations transforment tout d'abord le glucose en acide lactique. C'est ainsi que les ferments butyriques sont tout d'abord des ferments lactiques et c'est aux dépens de l'acide lactique qu'ils font la synthèse de l'acide butyrique et de l'alcool butylique.

Il en est de même des fermentations propioniques.

Enfin, malgré de nombreuses expériences négatives qui ont été faites ces dernières années, l'acide lactique semble jouer un rôle important dans la fermentation alcoolique. M. MAZÉ qui a insisté sur ce fait a notamment démontré que l'*Eurotiopsis Gayoni* fait fermenter cet acide.

Donc, comme l'acide lactique est un des produits secondaires de la fermentation butylèneglycolique, il est tout naturel de rechercher tout d'abord s'il n'en est pas un des termes intermédiaires.

Aucune recherche n'a été faite à ce sujet.

J'étudierai successivement :

1^o L'utilisation de l'acide lactique par le *B. subtilis* et le *B. lactis aerogenes*.

2^o L'utilisation du propylèneglycol par le *B. subtilis*.

3^o L'utilisation de l'acide lactique par le ferment acétique.

CHAPITRE PREMIER

Utilisation de l'acide lactique par le "*B. subtilis* " et le "*B. lactis aerogenes* "

Le *B. subtilis* et les microbes voisins sont extrêmement sensibles à l'acidité des milieux et pour leur faire oxyder l'acide lactique il faut le leur fournir sous forme de sels neutres. J'ai employé successivement le lactate d'ammoniaque et le lactate de soude, à la concentration de 2 o/o.

J'ai cherché tout d'abord à obtenir des cultures de ces bactéries dans des milieux minéraux où les lactates étaient les seuls composés organiques. Les résultats furent mauvais : ou bien le microbe ne poussait pas, ou bien son développement était extrêmement lent et restait très faible. J'ai eu alors recours à un milieu minéral additionné de 0,5 o/o de peptone de CHAPOTEAUT. Les cultures obtenues furent très belles. Alors que les milieux analogues dépourvus de lactate, donnaient des voiles minces, fragiles, à peine plissés, ceux contenant de l'acide lactique présentaient des voiles épais, très plissés, presque aussi beaux que ceux qui se forment en présence de glucose.

Cette première observation qu'il est facile de faire soit avec du lactate d'ammoniaque, soit même avec du lactate de sodium qui n'apporte pas un aliment azoté supplémentaire, prouve nettement que l'acide lactique est utilisé par le *B. subtilis*. Le

B. mesentericus ruber et quelques autres bactéries du même genre me donnèrent des résultats analogues.

Mais cette constatation est trop vague et pour préciser en quelle mesure et surtout d'après quel processus l'acide lactique peut être assimilé par ces organismes, j'ai étudié les échanges gazeux en cultures faites en présence de lactate.

La technique expérimentale et les méthodes analytiques furent analogues à celles que j'ai employé pour étudier la respiration du *B. subtilis* en milieu sucré.

Chaque flacon contient 50 cc. de bouillon minéral peptoné additionné de 2 grammes de lactate d'ammoniaque par 100 cc.

Ce bouillon est ensemencé avec le *B. subtilis* et mis à l'étuve à 30°. Le tableau suivant donne les résultats obtenus.

Age de la culture	jours	I 3	II 8
Volume d'air	cc.	3.167,00	3.707,65
Composition absolue	N —	2.537,18	2.962,73
	O —	488,57	317,39
	CO ² —	141,25	427,53
Volume initial	—	3.211,62	3.750,28

De ces données on tire les résultats suivants :

Durée	Oxygène absorbé	Acide carbonique dégagé	Rapport $\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$
jours	cc.	cc.	—
3	185,87	141,25	0,76
8	470,16	427,33	0,91

A côté de ces résultats je rappellerai les essais faits dans les mêmes conditions, avec le même milieu mais sans lactate et avec ou sans sucre.

Expérience sans sucre :

Durée	Oxygène absorbé	Acide carbonique dégagé	Rapport $\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$
jours	cc.	cc.	—
5	47,41	41,25	0,87

Expériences avec saccharose :

Durée jours	Oxygène absorbé cc.	Acide carbonique dégagé cc.	Rapport $\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$
2	147,86	259,46	1,75
6	478,65	736,37	1,53

Ces résultats montrent tout d'abord que l'acide lactique est bien un aliment puisque sa présence a augmenté beaucoup les échanges gazeux. Mais cependant il est moins facilement attaqué que le glucose : le *B. subtilis* absorbe en effet plus d'oxygène en milieu sucré qu'en milieu avec lactate. Donc l'acide lactique est assimilable par ce microbe, mais résiste plus à son action que le saccharose : il est plus stable. Cela est en accord avec ce fait que le *B. subtilis* ne pousse pas bien dans un milieu minéral où l'acide lactique est le seul aliment carboné.

D'autre part la nature des échanges gazeux est tout autre que celle que nous avons constaté dans les milieux sucrés. La quantité d'oxygène absorbé est toujours supérieure à celle qui est dégagée sous forme d'acide carbonique. Le rapport $\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$ reste toujours inférieur à l'unité. Or le quotient respiratoire dans la combustion complète de l'acide lactique est égal à 1.



d'où $\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2} = 1$.

La valeur du quotient respiratoire dans la combustion de l'acide lactique par le *B. subtilis* peut s'expliquer en partie par une combustion partielle de la peptone. Mais cela ne peut suffire et il faut qu'il y ait formation d'un produit plus oxydé que l'acide lactique ou ce qui revient au même plus oxydé que le glucose. Donc, tandis que dans l'oxydation au saccharose, l'étude des échanges gazeux permettait de mettre en évidence deux stades ; un de fermentation, l'autre de combustion, on ne peut voir dans le cas de l'acide lactique par cette méthode qu'un phénomène de combustion.

Pour expliquer ce fait deux hypothèses sont admissibles :

1° L'acide lactique est brûlé sans qu'il y ait fermentation préalable. C'est la combustion directe avec production d'un produit plus oxydé autre que l'acide carbonique ;

2° L'acide lactique subit une fermentation, mais par suite de la stabilité de cet acide, la fermentation est lente et ses produits sont oxydés au fur et à mesure de leur formation ce qui explique l'intensité des phénomènes d'oxydation et la valeur du rapport $\frac{\text{CO}^2}{\text{O}^2}$.

Aucun fait n'autorise à adopter une hypothèse plutôt qu'une autre. L'étude des échanges gazeux ne permet donc pas de formuler une conclusion en ce qui concerne le processus de l'assimilation de l'acide lactique par le *B. subtilis*.

J'ai alors fait la recherche du 2.3 butylèneglycol et de l'acétylméthylcarbinol dans des milieux peptonés additionnés de lactates. J'ai opéré dans des conditions très variées, de milieux de température et j'ai essayé des microbes divers du groupe du *B. subtilis*. Je n'ai obtenu que des résultats négatifs. On peut expliquer ce fait par deux hypothèses, comme pour le quotient respiratoire :

1° Ces bactéries ne donnent pas de 2.3 butylèneglycol et d'acétylméthylcarbinol aux dépens de l'acide lactique qu'elles oxydent directement ou qu'elles utilisent par un autre processus.

2° Ces microbes donnent du 2.3 butylèneglycol et de l'acétylméthylcarbinol aux dépens de l'acide lactique mais la formation de ces composés est lente et ils sont oxydés au fur et à mesure de leur production. On ne peut donc pas mettre leur présence en évidence.

Mais aucun fait ne permet d'accepter la première hypothèse plutôt que la seconde.

L'étude de l'assimilation des lactates par les microbes du groupe du *B. subtilis* ne donne pas le moyen de démontrer que l'acide est un des termes intermédiaires de la fermentation butylèneglycolique, mais elle ne prouve pas que cela ne

peut pas être. Elle montre que cet acide est assimilé, mais elle ne laisse pas entrevoir par quel mécanisme.

*
* *

J'ai recherché également si le *B. lactis aerogenes* ensemencé dans des milieux contenant de l'acide lactique ou des lactates pouvait donner du 2.3 butylèneglycol ou de l'acétylméthylcarbinol. Je me suis servi d'une bactérie isolée du lait par M. Ruor.

Une trop forte acidité entrave le développement du *B. lactis aerogenes*. Ainsi pour étudier son action sur l'acide lactique, j'ai ajouté cette substance peu à peu. J'utilise un milieu minéral peptoné à 0,5 o/o. Je mets 100 cc. de ce milieu dans un flacon d'ERLENMEYER de 250 cc. Le microbe travaille donc à la fois comme aérobie et anaérobie. J'ajoute au début 0 cc. 2 d'acide lactique stérile. Je mets les cultures à l'étuve à 30°. Le microbe pousse bien. Au bout de 24 heures je fais aseptiquement, une nouvelle addition de 0 cc. 2 d'acide lactique stérile. Je continue à ajouter ainsi de cet acide par petites portions chaque fois que le milieu est devenu neutre. Je peux ainsi, en dix jours, mettre jusqu'à 1 cc. environ d'acide lactique dans 100 cc. de culture. J'ai analysé de ces milieux à des âges divers et en aucun cas je n'ai pu trouver de 2.3 butylèneglycol ou d'acétylméthylcarbinol. Cependant le microbe avait pris un développement plus intense que dans un bouillon témoin identique mais sans acide lactique.

J'ai étudié également l'action du *B. lactis aerogenes* sur le lactate de soude à 1 et 2 o/o, le lactate d'ammoniaque et le lactate de chaux à la même concentration. J'ai opéré dans des conditions diverses, mais dans tous les cas, alors que j'ai constaté que ces sels favorisaient le développement du microbe, il m'a été impossible de mettre en évidence la formation du 2.3 butylèneglycol et de l'acétylméthylcarbinol.

Mais comme pour le *B. subtilis* et les microbes voisins, ces essais négatifs avec le *B. lactis aerogenes* ne prouvent pas que

l'acide lactique ne puisse pas subir la fermentation butylèneglycolique.

En effet, d'autres variétés de ce microbe auraient peut-être permis de constater la synthèse du 2.3 butylèneglycol ou de l'acétylméthylcarbinol aux dépens de l'acide lactique et, même si cela n'était pas, on peut très bien admettre la formation de ces corps et leur destruction simultanée.

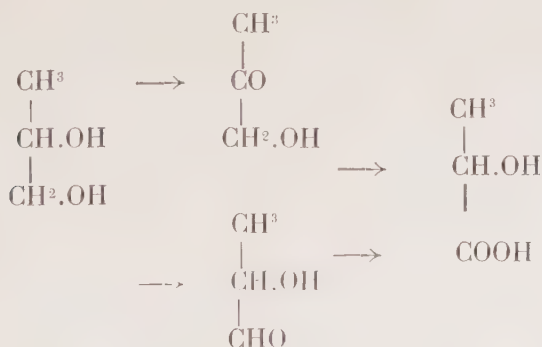
Ponc l'étude de l'action du *B. subtilis* et du *B. lactis aerogenes* sur les lactates ne permet de formuler aucune conclusion au sujet du rôle que peut jouer l'acide lactique dans la fermentation butylèneglycolique sous l'influence de ces bactéries.

CHAPITRE II

Oxydation du propylglycol par le “ *B. subtilis* ”

L'isopropylglycol ou le 1.2 propylèneglycol est l'alcool de l'acide lactique : $\text{CH}^3.\text{CH}.\text{(OH)}.\text{CH}^2.\text{(OH)}$. Il peut chimiquement donner très facilement naissance à de l'acide lactique par un processus d'oxydation. Je citerai par exemple l'action du noir de platine sur ce glycol. KLING, par l'action de l'eau de brome transforme ce propylglycol en acétol (38) qui oxydé donne l'acide lactique (39).

Donc, dans un milieu oxydant on peut considérer le 1.2 propylglycol comme de l'acide lactique à l'état naissant, que la transformation s'effectue soit par l'intermédiaire de l'acétol soit par celui de l'aldéhyde lactique.

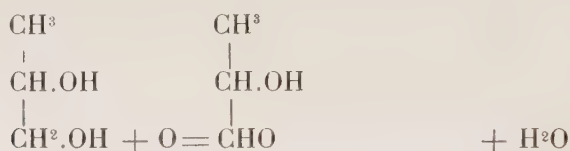


Par conséquent il était intéressant de rechercher l'action du *B. subtilis* sur le glycolpropylénique.

En 1881, LE BEL (40) fait agir une bactérie du groupe du *B. subtilis* le *bacterium termo*, sur le propylèneglycol inactif. Il n'opère pas en culture pure mais observe néanmoins qu'il y a en plus de la formation d'un peu d'acide lactique et d'acide propionique, dédoublement du glycol : l'isomère droit est brûlé plus vite que le gauche qui s'accumule dans la culture.

En 1897, PÉRÉ (41) reprend cette question avec le *Tyrophrix tenuis*. Une culture de ce microbe dans du bouillon de viande additionné de 4 à 5 o/o de propylglycol est distillé au bout de 15 jours. Le distillat est fortement réducteur, ne recolore pas la fuchsine décolorée par le bisulfite de soude, et est légèrement lévogyre.

La réduction de ce distillat donne de l'alcool isopropylique, des traces d'alcool allylique et du propylglycol droit. PÉRÉ conclut de tous ces faits à la présence du propylaldol qui s'est formé par oxydation.



C'est le pouvoir rotatoire qui le décide à admettre la présence de l'aldéhyde lactique plutôt que celle du propylacétol



J'ai repris cette question avec le *B. subtilis*. Le 1.2 propylglycol du commerce n'est pas pur et est antiseptique. Je l'ai purifié par la méthode indiquée par KLING (42).

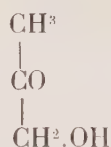
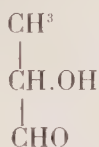
J'ajoute le propylglycol purifié, à raison de 2 o/o, à un milieu minéral peptoné à 0,5 o/o. J'obtiens dans ces conditions de belles cultures. Les voiles couvrent toute la surface du milieu, sont plissés, mais restent minces : ils sont plus beaux que ceux qui se forment dans le même bouillon sans propylglycol, mais moins épais que dans les milieux sucrés, ou additionnés de lactates.

Je distille ces cultures à des temps variables, dans le vide

à 45-50°. J'obtiens un distillat fortement réducteur vis-à-vis de la liqueur de FEHLING, légèrement dextrogyre, ou capable de recolorer la fuchsine décolorée par le bisulfite de soude mais donnant les réactions de LEGAL et ceux de l'iodoforme en présence d'iode et de soude. Il décolore le bleu de méthylène.

Traité par la phénylhydrazine en milieu acétique, ce distillat donne une osazone. Cette osazone brute, lavée à l'eau puis desséchée dans le vide sur l'acide sulfurique, fond à des températures variables : 150°, 165°, 170° et 180°. Ce n'est donc pas une phénylosazone pure mais bien un mélange.

Je traite cette osazone brute par l'alcool absolu et je la lave ainsi sommairement puis je commence sa dissolution à fond. Les parties les plus solubles de ce mélange, après évaporation et dessiccation dans le vide sur l'acide sulfurique fondent à 144°-145°. Comme osazone fondant à cette température on connaît celle du méthylglyoxal qui est aussi celle du propylaldol et du propylacétol.



Donc il existe dans le distillat un de ces trois corps. Le pouvoir rotatoire indique que le second, le propylaldol doit y être présent : c'est en effet le seul ayant un atome de carbone asymétrique. Les conclusions de PÉRÉ sont ainsi vérifiées. Mais peut-être y a-t-il aussi en même temps du propylacétol.

La phénylosazone, lavée par l'alcool, donne suivant que la dissolution est poussée plus ou moins loin, des produits qui, après dessiccation, offrent des points de fusion divers mais supérieures à 145° : 150°, 155°, 160°, 180°, 200°.

Si l'on pousse la purification de plus en plus loin on obtient une poudre jaune très clair très peu soluble et dont le point de fusion atteint, dans les diverses expériences que j'ai faites, 230°, 232°, 233°, 231°, 229°. Le point de fusion n'est donc

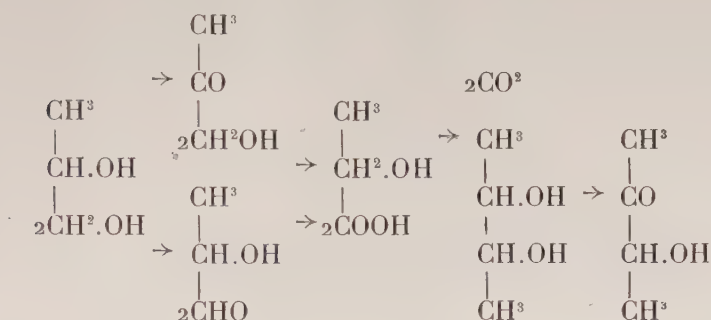
pas encore fixe. Mais il est difficile de pousser plus loin la purification de cette osazone car elle se dissout peu à peu bien que difficilement et on a bientôt fort peu de produit à manipuler.

Néanmoins de ces essais on peut conclure qu'à côté de la phénylosazone du méthylglyoxal il existe une autre osazone dont le point de fusion est supérieur à 230° . Or celle de l'acétylméthylcarbinol fond à 244° . Il est donc naturel de penser que c'est elle qui existe dans le mélange et que cet alcool acétonique existe dans les cultures de *B. subtilis* faites en présence de propylglycol. Cependant, je n'ai pu obtenir cette osazone à l'état de pureté. Ainsi la détermination de son point de fusion ne me permet aucune conclusion précise.

Je traite une osazone purifiée et fondant à 230° , par de l'acide chlorhydrique, au bain-marie, dans un ballon fermé par un réfrigérant ascendant. Le liquide est rectifié dans une colonne à reflux. Dans les premières portions, avant la vapeur d'eau passe une vapeur qui se condense en un liquide vert qui ne réduit pas à froid la liqueur de FEHLING mais la réduit énergiquement à chaud et est décoloré instantanément par l'ammoniaque. Il offre donc les caractères du biacétyle. $\text{CH}^3.\text{CO}.\text{CO}.\text{CH}^3$ qui a la même osazone que l'acétylméthylcarbinol $\text{CH}^3.\text{CO}.\text{CH}.\text{OH}.\text{CH}^3$. Donc, l'osazone fondant à 230° ayant régénéré le biacétyle sous l'influence de l'acide chlorhydrique, le distillat des cultures du *B. subtilis* en présence de propylglycol doit contenir de l'acétylméthylcarbinol.

Ces expériences prouvent que le *B. subtilis* peut faire la synthèse de l'acétylméthylcarbinol aux dépens du propylglycol. Mais tout d'abord le propylglycol est oxydé et donne du propylglycol et peut-être aussi du propylacétol qui tous deux sont capables de fournir de l'acide lactique. D'autre part, étant donné leur formule, il est difficile d'admettre qu'ils puissent donner directement par condensation du butylèneglycol ou de l'acétylméthylcarbinol. Dans ces conditions on est amené à considérer tout naturellement que la synthèse de ces

composés à quatre atomes de carbone s'est faite aux dépens de l'acide lactique à l'état naissant.



C'est là un argument sérieux en faveur de l'hypothèse suivant laquelle l'acide lactique joue le rôle d'intermédiaire dans la fermentation butylèneglycolique ; mais ce n'est pas la preuve directe, évidente, que cette hypothèse est bien conforme à la réalité.

CHAPITRE III

Utilisation de l'acide lactique par le ferment acétique. Production d'acétylméthylcarbinol

La combustion de l'acide lactique par le *B. subtilis* est brutale et ne permet pas l'étude des produits intermédiaires qui doivent se former.

Le ferment acétique, comme le *B. subtilis*, provoque des oxydations intenses, mais contrairement à ce dernier, il travaille par étapes successives. Il peut brûler presque toutes les matières organiques, mais il le fait par stades : les produits intermédiaires ménagés deviennent apparents. Aussi, à l'instigation de M. MAZÉ, ai-je étudié l'action du ferment acétique sur l'acide lactique au point de vue spécial de la fermentation butylèneglycolique.

La bactérie étudiée dans ces essais a été isolée d'une mère du vinaigre. Cultivée sur glycérine, elle donne une culture d'abord glaireuse, puis cellulosique et bientôt opaque, épaisse et dure : la glycérine est transformée en dioxyacétone, comme l'a observé M. G. BERTRAND avec la bactérie du sorbose. L'alcool est oxydé et donne de l'acide acétique.

Ce microbe fut ensemencé soit dans du bouillon de haricots, soit dans le milieu minéral peptoné à 0,5 o/o, additionnés l'un et l'autre de 2, 1 ou 0,5 o/o d'acide lactique. Les cultures sont maintenues à 20-25°.

Les milieux à 2 o/o d'acide lactique restent stériles. Dans

les milieux à 1 ou 0,5 o/o, on observe par places au fond du vase des peaux. Elles se rejoignent peu à peu, couvrent toute la paroi inférieure du récipient, gagnent par place la surface libre du liquide : là la culture augmente vite, forme une masse opaque, blanc ivoire.

Ces masses se rejoignent à la longue et donnent une culture cellulosique de même aspect et de même consistance que celle qui se forme en milieu glyciné. Sa production est cependant plus lente et finalement moins intense.

Si on filtre le bouillon et si on évapore le liquide dans le vide au bain-marie à 45°-50°, on obtient un distillat très légèrement lévogyre (— 14'; 26'; — 25' dans le tube de 40 cm.) ; fortement réducteur vis-à-vis de la liqueur de FEHLING, du nitrate d'argent ammoniacal, du bleu de méthylène. Il ne recolore pas la fuchsine décolorée par le bisulfite de soude. Le distillat conserve ces propriétés que la distillation soit faite en milieu acide, neutre ou alcalin. Elles sont donc dues à la présence d'un corps neutre.

Traité par la phénylhydrazine en milieu acétique, ce liquide distillé donne une osazone jaune clair peu soluble dans l'alcool, l'éther et autres solvants. Lavée à l'alcool, desséchée dans le vide sur l'acide sulfurique, elle fond à 244° exactement. Mise en suspension dans l'eau additionnée d'acide chlorhydrique, et portée à l'ébullition, cette osazone est décomposée et par rectification, donne des vapeurs qui passent avant la vapeur d'eau et se condensent en un liquide vert, qui réduit fortement la liqueur de FEHLING à chaud et est décoloré instantanément par l'ammoniaque.

Cette phénylosazone est donc celle du biacétyle et le distillat de la culture du ferment acétique sur acide lactique doit renfermer soit du biacétyle, soit de l'acétylméthylcarbinol.

La rectification du distillat ne permet pas de mettre en évidence la présence du biacétyle. D'ailleurs le pouvoir rotatoire indique celle d'un corps actif : donc l'acétylméthylcarbinol doit exister dans ce liquide.

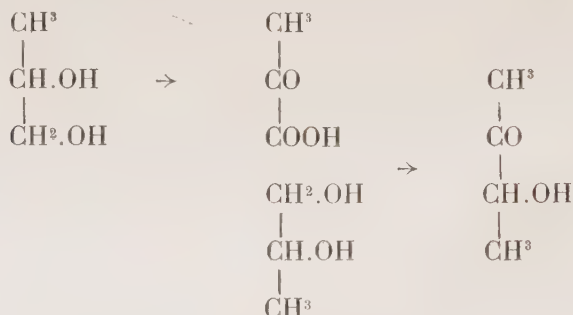
Ce distillat est traité au bain-marie à l'ébullition par un peu

d'eau de brome : quand tout le brome a été transformé en acide bromhydrique on constate que le liquide, primitivement incolore, est vert pâle. En le rectifiant, après saturation avec le carbonate de chaux, on obtient, passant vers 90°, des vapeurs qui se condensent en un produit vert analogue au biacétyle.

Donc le ferment acétique peut donner aux dépens de l'acide lactique de l'acétylméthylcarbinol.

La recherche du 2.3 butylèneglycol faite suivant la technique que j'ai indiquée dans la deuxième partie de ce travail a donné des résultats négatifs.

On pourrait interpréter ce fait en admettant que l'acétylméthylcarbinol s'est formé aux dépens de l'acide lactique et de l'acide pyruvique provenant d'une oxydation de l'acide lactique.



Dans les conditions dans lesquelles on a opéré, on n'a pu mettre en évidence la présence de l'acide pyruvique.

D'autre part, ce que nous savons des relations biologiques du 2.3 butylèneglycol et de l'acétylméthylcarbinol nous autorisent à admettre que le glycol a été formé effectivement, puis oxydé au fur et à mesure.

D'ailleurs, même avec le *B. subtilis* en milieux sucrés, on peut dans les cultures vieilles, où les phénomènes de fermentations sont ralentis et où seuls ceux d'oxydation sont intenses, trouver de l'acétylméthylcarbinol alors qu'il n'y a plus de 2.3 butylèneglycol. Or on sait en ce cas que ce produit s'est bien formé, mais a été oxydé.

Donc l'absence du 2-3 butylèneglycol peut fort bien s'expliquer et la présence de l'acétylméthylcarbinol suffit à elle seule pour prouver que l'acide lactique est capable de subir la fermentation butylèneglycolique sous l'influence du ferment acétique.

La présence de traces d'acétylméthylcarbinol dans les vinaigres a été signalée par PASTUREAU (43). Cet auteur a démontré que cet alcool cétonique ne préexiste pas dans les vins, mais se forme pendant leur oxydation sous l'influence du ferment acétique (44). Mais cet auteur a attribué la production de ce composé à la transformation du butylèneglycol qui d'après HENNINGER serait un des produits de la fermentation alcoolique.

Le glycol isolé par HENNINGER est l'isobutylèneglycol qui par oxydation ne peut donner d'acétylméthylcarbinol. Aussi PASTUREAU admet-il qu'à côté de ce glycol existe également le 2.3 butylèneglycol qui ainsi que l'a établi M. KLING, peut être transformé en acétylméthylcarbinol par le ferment acétique.

Donc, d'après cet auteur, le ferment acétique en donnant cet alcool cétonique ne fait pas une synthèse, mais provoque une simple oxydation.

Les faits exposés au sujet de l'action de ce microbe sur l'acide lactique sont tout autres et montrent que ce ferment peut effectuer une véritable synthèse.

L'acétylméthylcarbinol qui est ainsi formé par ce ferment acétique est aussi oxydé à son tour. L'osazone est pure et montre que le pouvoir réducteur du distillat peut servir à doser l'acétylméthylcarbinol.

CULTURES DE FERMENT ACÉTIQUE dans du bouillon de haricots additionné de 1 o/o d'acide lactique.

Durée jours	Acétylméthylcarbinol en mgr. p. 100 cc. culture
17	62
27	134
31	traces

Voici une culture en milieu minéral peptoné additionné de 1 o/o d'acide lactique.

29 jours	121 mgr.
----------	----------

CONCLUSIONS DE LA DEUXIÈME PARTIE

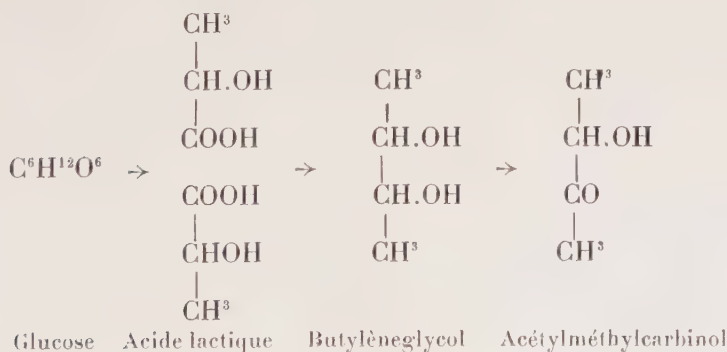
1° Le *B. subtilis* et les microbes voisins, le *B. lactis aerogenes* assimilent l'acide lactique, mais ne peuvent, dans les conditions dans lesquelles j'ai opéré, provoquer à ses dépens la synthèse du 2.3 butylèneglycol en celle de l'acétylméthylcarbinol. Ces résultats négatifs ne prouvent pas d'ailleurs l'impossibilité de cette synthèse par ces bactéries.

2° Le *B. subtilis* assimile le propylèneglycol en donnant de l'acétylméthylcarbinol. Pour expliquer cette réaction on est amené à admettre qu'elle se produit par l'intermédiaire de l'acide lactique.

3° Le ferment acétique transforme l'acide lactique en acétylméthylcarbinol. Il n'y a pas, dans les conditions dans lesquelles on a opéré, formation de 2.3 butylèneglycol.

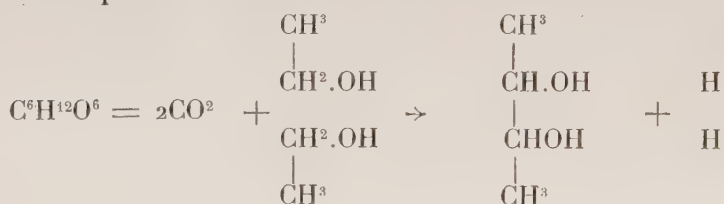
4° L'acide lactique étant un des produits secondaires de la fermentation butylèneglycolique du glucose dans le cas du *B. lactis aerogenes* et du *B. cloacae*, et étant d'autre part capable de donner de l'acétylméthylcarbinol, apparaît comme un des termes intermédiaires de cette fermentation.

Le schéma que j'en ai donné dans la seconde partie de ce travail peut ainsi se préciser à nouveau :



Mais il faut remarquer que d'autres termes intermédiaires peuvent venir s'intercaler entre le glucose et l'acide lactique et entre l'acide lactique et le 2.3 butylèneglycol.

Et notamment on peut remarquer que le butylèneglycol est constitué par deux molécules d'alcool éthylique condensées avec élimination de deux atomes d'hydrogène. On peut ainsi admettre que le butylèneglycol dérive d'une fermentation alcoolique.



C'est là une hypothèse qu'aucun fait actuellement ne vérifie. Mais aucun fait d'autre part n'y est contraire et elle permet d'expliquer tout ce que l'on sait sur la fermentation butylèneglycolique.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

1° Les microbes du groupe du *Bacillus subtilis* qui sont dominants dans les lits percolateurs et dans le sol, attaquent avec intensité les composés azotés et ternaires et jouent ainsi un rôle naturel important dans les processus de dégradation et de minéralisation des matières organiques. Ils sont notamment parmi les principaux agents de l'épuration bactérienne des eaux d'égouts.

2° Ils oxydent les matières organiques azotées sans provoquer un dégagement d'azote libre.

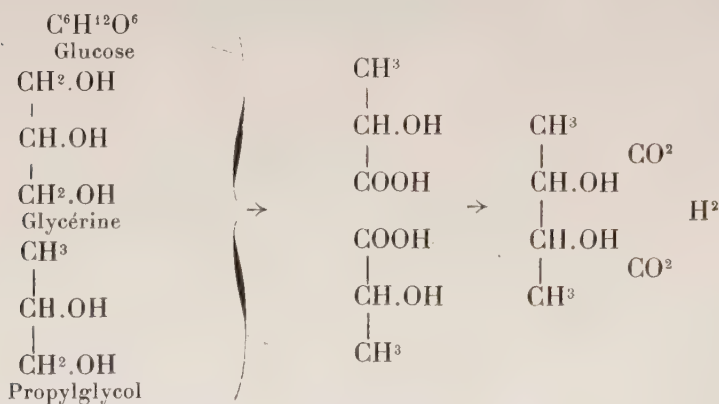
3° Certains de ces microbes, en présence d'air et de produits organiques oxydables, réduisent les nitrates dont ils assimilent l'azote, mais dont ils ne peuvent utiliser l'oxygène pour résister à l'asphyxie.

4° Ces bactéries, pour assimiler le glucose, commencent par le faire fermenter. Cette dislocation a lieu au contact de l'air, dans des conditions de vie normale. Les produits ainsi formés sont ensuite oxydés et utilisés. Donc, ici comme dans la fermentation alcoolique, suivant l'expression de M. MAZÉ : « Les phénomènes de fermentation sont des actes de digestion. »

5° La fermentation aboutit à la formation du 2.3 butylène-glycol qui ultérieurement donne de l'acétylméthylcarbinol. La fermentation que l'on peut appeler fermentation butylèneglycolique, n'est pas spéciale aux bactéries du groupe du *B. subtilis*. Elle peut en effet être encore provoquée non seulement par les *B. lactis aerogenes* et le *B. cloacae*, mais aussi par le ferment acétique.

Elle est donc d'une grande généralité et se place par son importance à côté des fermentations alcoolique, propionique et butyrique.

6° L'acide lactique est un des termes intermédiaires de la fermentation butylèneglycolique dont on peut représenter le processus chimique par le schéma suivant :

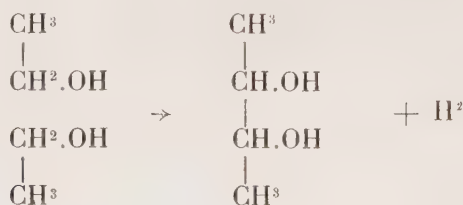


Dans le cas des fermentations aérobies, l'hydrogène est oxydé.

Ce schéma est encore incomplet et des intermédiaires manquent encore.

7° Je terminerai par une hypothèse.

Le 2.3 butylèneglycol peut être considéré comme de l'alcool éthylique condensé avec élimination d'hydrogène.



On est ainsi amené à penser que l'alcool éthylique est un des termes intermédiaires de la fermentation butylèneglycolique qui ne serait aussi qu'une fermentation alcoolique continuée.



BIBLIOGRAPHIE

- (1) Recherches sur l'épuration biologique et chimique des eaux d'égouts
CALMETTE, ROLANTS, CONSTANT, BOULLANGER, MASSOL. lib. Masson, Paris,
1905 à 1913
- (2) MUNTZ et LAINÉ. — *Moniteur scientifique*, 1908, avril.
- (3) STEVENS et WITHERS. — *Centralblatt f. B.*, t. XXVII, 1910, p. 169.
- (5) CALMETTE. — *Loc. c.*, 1905, t. I, p. 86, 1907, t. II, p. 34.
- (6) MARCHAL — *Annales agron.*, 1893, t. XIX, p. 506.
- (7) GOTTHEIL. — *Centralblatt f. B.*, t. VII, 1901, p. 430.
- (8) MEYER — *Pratikum der botanischen Bakterienkunde*, Jéna, 1903.
- (9) CHESTER. — *Centralblatt f. B.*, t. XIII, 1904, p. 737.
- (10) DUCLAUX. — *Le lait*, p. 213, lib. Baillière, Paris, 1887.
- (11) MUNTZ et LAINÉ. — *Moniteur scientifique*, 1912, p. 95.
- (12) DEHÉRAIN. — *Chimie agricole*, p. 782 Masson, Paris, 1908.
- (13) MAZÉ. — *Ann. de l'Institut Pasteur*, 1911, p. 289 et 369.
- (14) STOKLASA et VITEK. — *Centralblatt f. B.*, 1905, t. XIV, p. 102, 183,
493.
- (15) LEMOIGNE. — *C. R. Ac. des Sc.*, 1911, t. CLII, p. 1873.
- (16) VANDELELDE. — *Zeitschr., f. phys. Chemie*, VIII, 1884.
- (17) PÉRÉ. — *Ann. de l'Institut Pasteur*, t. X, 1896, p. 417.
- (18) DESMOTS. — *C. R. Ac. des Sc.*, t. CXXXVIII, 1904, p. 581.
- (19) GRIMBERT. — *C. R. Ac. des Sc.*, t. CXXXII, 1901, p. 706.
- (20) FERNBACH. — *C. R. Ac. des Sc.*, t. CLI, 1910, p. 1004.
- (21) HARDEN et NORRIS. — *Proceedings of the Royal Society*.
- (22) MAZÉ. — *Ann. de l'Institut Pasteur*, 1902, mars, mai.
- (23) MAZÉ. — *Ann. de l'Institut Pasteur*.
- (24) DENIGES. — *C. R. Ac. des Sc.*, 1909, t. CXLVIII, p. 172.
- (25) WOHL et NEUBERG. — *Ber. d. deutsch. Chem. G.*, t. XXXIII, 1900, p. 3095.
- (26) WALPOLE. — *Proceedings of the R. Soc.*, 1911, p. 272.
- (27) BERTRAND. — *Bull. Soc. Chim.*, 1906, t. XXXV, p. 1 285.
- (28) KLING. — *Bull. Soc. Chim.*, t. XXXV, 1906, p. 209
- (29) SABATIER et MAILHE. — *Bull. Soc. Chim.*, 1907, p. 521.
- (30) HARDEN et NORRIS. — *Proceedings of the R. Soc.*, 1912, p. 492.
- (31) HENNINGER — *C. R. Ac. des Sc.*, 1882, t. XCV, p. 94.

- (32) CLAUDEN et MORIN — *C. R. Ac. des Sc.*, 1887, t. CIV, p. 1109.
- (33) MORIN — *C. R. Ac. des Sc.*, t. CV, p. 1019.
- (34) HENNINGER et SANSON. — *C. R. Ac. des Sc.*, t. CVI, p. 208
- (35) HARDEN et WALPOLE. — *Proceedings of the R. Soc.*, 1906, t. LXXIII,
p. 399.
- (36) THOMSON. — *Proceedings of the R. Soc.*, 1912, p. 500.
- (37) HARDEN et NORRIS. — *Proceedings of the R. Soc.*, 1912, p. 73.
- (38) KLING. — *C. R. Ac. des Sc.*, 1899, t. CXXIX, p. 219.
- (39) KLING. — *Bull. Soc. Chim.*, t. XXXI, 1904, p. 1299.
- (40) LE BEL. — *C. R. Ac. des Sc.*, 1881, t. XCII, p. 532.
- (41) PÉRÉ. — *Ann. de l'Institut Pasteur*, t. XI, 1897, p. 600.
- (42) KLING. — *C. R. Ac. des Sc.*, t. CXXVIII, p. 244.
- (43) PASTUREAU. — *Journal de Pharmacie et de Chimie*, t. XXI, 1905,
p. 593.
- (44) PASTUREAU. — *Journal de Pharmacie et de Chimie*, t. XXVII, 1908,
p. 10.

SECONDE THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Influence de la pression sur les Courbes de distillation
des acides volatils.

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 13 mai 1913

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

PAUL APPELL.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Vice-Recteur de l'Académie de Paris,

Pour le Vice-Recteur :

L'Inspecteur de l'Académie,

ISTRIA.

